

(19) 日本国特許庁 (J P)

(12) 公表特許公報 (A)

(11) 特許出願公表番号

特表2002-505740

(P2002-505740A)

(43) 公表日 平成14年2月19日 (2002.2.19)

(51) Int.Cl.⁷

G 0 1 N 27/62

識別記号

33/68

F I

G 0 1 N 27/62

33/68

テーマコード (参考)

V

D

審査請求 未請求 予備審査請求 有 (全 49 頁)

(21) 出願番号 特願平10-550136
(86) (22) 出願日 平成10年5月22日 (1998.5.22)
(85) 翻訳文提出日 平成11年11月22日 (1999.11.22)
(86) 国際出願番号 P C T / G B 9 8 / 0 1 4 8 6
(87) 国際公開番号 W O 9 8 / 5 3 3 2 3
(87) 国際公開日 平成10年11月26日 (1998.11.26)
(31) 優先権主張番号 9 7 1 0 5 8 2 . 9
(32) 優先日 平成9年5月22日 (1997.5.22)
(33) 優先権主張国 イギリス (G B)

(71) 出願人 オックスフォード・グリコサイエンシー
ズ・(ユーケー)・リミテッド
イギリス、オーエックス14・3ワイエス、
アビングドン、アビングドン・サイエン
ス・パーク、バートン・レイン、ザ・クワ
ドラント10番
(72) 発明者 バレク、ラジ・ビク
イギリス、オーエックス6・0エヌエス、
オックスフォードシャー、ニア・ウェンド
ルベリー、ラングフォード・レイン、アル
チェスター・ハウス
(74) 代理人 弁理士 青山 葆 (外1名)

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 新たなペプチド配列決定法

(57) 【要約】

(a) 当該未知ペプチドに対する分子量および実験フラグメンテーションスペクトルを測定し; (b) 該未知ペプチドの実験フラグメンテーションスペクトルを、該未知ペプチドの分子量に対応する総質量を有する全ての可能性のあるアミノ酸一次配列からなるペプチドライブラリーにつき計算された理論的フラグメンテーションスペクトルと比較し; 次いで、(c) 該未知ペプチドのフラグメンテーションスペクトルに最も厳密に適合する理論的フラグメンテーションスペクトルの有するペプチドライブラリー中のペプチドを同定することを特徴とする未知ペプチドのアミノ酸配列を決定する方法。

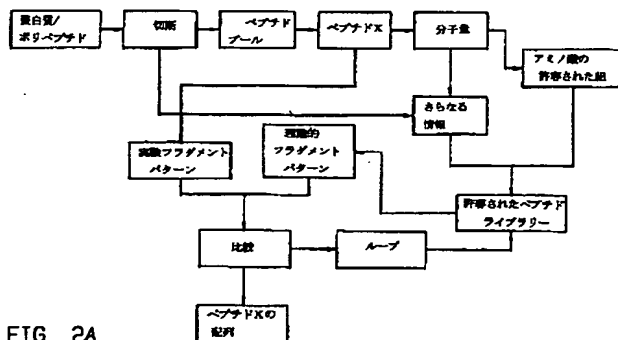


FIG. 2A

【特許請求の範囲】

1. (a) 当該未知ペプチドに対する分子量および実験的フラグメンテーションスペクトルを測定し；

(b) 該未知ペプチドの実験的フラグメンテーションスペクトルを、該未知ペプチドの分子量に対応する総質量を有する全ての可能性のあるアミノ酸一次配列からなるペプチドライブラリーにつき計算された理論的フラグメンテーションスペクトルと比較し；次いで

(c) 該未知ペプチドのフラグメンテーションスペクトルに最も厳密に適合する理論的フラグメンテーションスペクトルを有するペプチドライブラリー中のペプチドを同定することを特徴とする未知ペプチドのアミノ酸配列を決定する方法。

2. 該未知ペプチドの分子量を約30 ppmまでの精度で測定する請求項1記載の方法。

3. 可能性のあるアミノ酸一次配列の各々の総質量が該未知ペプチドの分子量プラスまたはマイナス30 ppmの範囲内にある請求項1または2記載の方法。

4. 該未知ペプチドの実験的フラグメンテーションスペクトルと該ペプチドライブラリーにつき計算された理論的フラグメンテーションスペクトルの各々との間の適合近接性の示度を計算することをさらに含む前記請求項のいずれか1記載の方法。

5. 該適合近接性示度を計算するときに事前測定された閾値を超える強度を有するピーク値を選択することをさらに含む請求項4記載の方法。

6. 該実験的フラグメンテーションスペクトルを正規化することをさらに含む前記請求項のいずれか1記載の方法。

7. 該アミノ酸がトリプトファン、アルギニン、ヒスチジン、グルタミン酸、グルタミン、アスパラギン酸、ロイシン、トレオニン、プロリン、アラニン、チロシン、カルバミドシステイン、フェニルアラニン、メチオニン、リジン、アスパラギン、イソロイシン、システイン、バリン、セリン、およびグリシンから

選択される前記請求項のいずれか1記載の方法。

8. 該アミノ酸が非天然アミノ酸または天然に産出するアミノ酸の化学的修飾形態を含む請求項1ないし6のいずれか1項記載の方法。

9. 該未知ペプチドが約1,400ダルトンを超える分子量を有する前記請求項のいずれか1記載の方法。

10. 該未知ペプチドに対する分子量を質量分析計を用いて決定する前記請求項のいずれか1記載の方法。

11. 該質量分析計が飛行時間質量分析計である請求項10記載の方法。

12. 該未知ペプチドに対する分子量およびフラグメンテーションスペクトルが、タンデム質量分析計を用いて決定される請求項10記載の方法。

13. 該未知ペプチド中の1以上のアミノ酸をその実験的フラグメンテーションスペクトルからまたはその調製方法から同定し、および該1以上の同定したアミノ酸を用いてすべての可能性のある一次配列のライブラリーを拘束する前記請求項のいずれか1記載の方法。

14. 該スペクトルがインモニウムイオン領域を有し、該インモニウムイオン領域を用いて該未知ペプチドに含有される1以上のアミノ酸を同定する請求項12記載の方法。

15. 該同定がアミノ酸の既知の特徴と該実験的フラグメンテーションスペクトルの特徴とを比較することを含む請求項13または14記載の方法。

16. 該1以上のアミノ酸がN-末端またはC-末端アミノ酸であるか、あるいはそれらを含む請求項13ないし15のいずれか1記載の方法。

17. 該ライブラリー中の各配列が単一の事前測定された分子量に対応する分子量を有するペプチドを表わすアミノ酸ライブラリーを生成する方法であって、

該事前測定された分子量に対応する分子量を有する許容されたアミノ酸の組合せの一組を定義し；次いで

該組の各組合わせにおけるアミノ酸の全ての可能性のある一次配列のライブラリーを生成し、

ここに、該ライブラリーは請求項13ないし16のいずれか1記載に定義した同

定によって拘束されることを特徴とする該方法。

18. 請求項2ないし12いずれか1項記載の特徴をさらに含む請求項17記載の方法。

【発明の詳細な説明】

新たなペプチド配列決定法

発明の分野

本発明は、既知の事前定義データベースまたは連続したアミノ酸残基分析のいずれかに頼るまたは参照することのないペプチド、ポリペプチドまたは蛋白質中のアミノ酸の正確な一次配列の決定法に関する。それ自体、本発明の方法は、真に新たなペプチド配列決定法である。

発明の背景

アミノ酸の配列としてのペプチド(この用語はポリペプチドまたは蛋白質も含む)の組成は、よく理解されている。各ペプチドは、アミノ酸の正確な一次配列によってユニークに定義される。ペプチドにおけるアミノ酸の正確な直鎖状整列または配列の知識は、アミノ酸配列がオリゴヌクレオチドプローブおよびポリメラーゼ鎖反応(「PCR」)プライマーに要求される情報を提供するDNAクローニングを含めた、様々な目的に必要である。また、正確な配列の知識は、抗体産生のためのペプチド合成を可能とし、ペプチドの同定を供し、組換え産物の特徴付けを助け、翻訳後修飾の研究に有用である。

様々な配列決定法は、アミノ酸配列情報を得るのに利用可能である。例えば、一連の化学反応、例えばエドマン反応または酵素反応、例えばエキソペプチダーゼ反応を用いて、未知ペプチドの連続フラグメントを調製する。連続フラグメントの分析または取出されたアミノ酸の連続分析のいずれかを用いて、未知ペプチドの直鎖状アミノ酸配列を決定する。典型的には、エドマン分解化学を最新の自動蛋白質シーケンサーにおいて用いる。

エドマン分解において、ペプチドは、エドマン試薬であるフェニルイソチオシアネート(PITC)を用いてN末端からの分解によって配列決定する。分解プロセスは、3工程、すなわち、カップリング、切断および転化を含む。カップリング工

程において、PITCは、ペプチド、ポリペプチドまたは蛋白質のN末端残基を修飾する。次いで、酸切断は、不安定なアニリノチアゾリノン(ATZ)誘導体

の形態のN末端アミノ酸を切断し、反応性N末端のあるペプチドを遊離し、1個のアミノ酸分短くする。ATZ誘導体は、同定のための転化工程において、典型的には逆相高性能液体クロマトグラフィー(RP-HP LC)を用いて、安定なフェニルチオヒダントインに転化される。短くなったペプチドは、分解反応のもう一つのサイクルを受けることができる遊離N末端が残される。サイクルの繰り返しの結果、該ペプチド中の各アミノ酸を連続して同定する。アミノ酸遊離の連続特性のために、1分子の物質のみが、同時に配列決定できる。従って、ペプチド試料は、正確で効率のよい配列決定については非常に純粋でなければならない。典型的には、試料はHP LCまたはSDS-PAGE技術で精製されなければならない。

多くのペプチド配列が、エドマン分解によって決定されてきたが、大部分のペプチド配列は、対応する遺伝子またはcDNAから決定されたDNA配列から導き出される。しかしながら、DNA配列決定技術を用いた蛋白質配列の決定は、蛋白質を合成するのに用いた特定のDNA配列の知識を要する。蛋白質または蛋白質を合成するのに用いた特定のDNA配列の性質が不明である場合に用いることができない。

また、ペプチド配列は、未知ペプチドの実験的フラグメンテーションスペクトルから決定でき、典型的には、質量分析計における活性化または衝突誘導フラグメンテーションを用いて得ることができる。タンデム質量分析法(MS/MS)技術は、特に有用であった。MS/MSにおいては、まずペプチドが精製され、次いで第一質量分析計に注入される。この第一質量分析計は、選択装置として機能し、ペプチドの混合物から特定分子量の標的ペプチドを選択し、分析物から大部分の汚染物質を除去する。次いで標的分子を活性化または断片化させて、標的ペプチドまたは親のフラグメントである低質量の種々のペプチドの親ペプチドから混合物を形成させる。次いで、第二質量分析計(すなわち、工程)を通じて混合物を選択し、フラグメントスペクトルを得る。

典型的には、過去において、ペプチド配列を決定するためのフラグメンテーション

ヨ

ンスペクトルの解析は、フラグメンテーションスペクトルに基づく1以上のアミノ酸配列を仮定することを含んだ。ある好ましい場合において、熟練した研究者は、フラグメンテーションスペクトルを解釈して、未知ペプチドの直鎖状アミノ酸配列を決定できる。次いで、候補配列は、蛋白質配列ライブラリーにおける既知のアミノ酸配列と比較できる。

一つの戦略において、各アミノ酸の質量を親ペプチドの分子量から差し引いて、各アミノ酸が末端位置にあると仮定してフラグメントの可能な分子量を決定する。次いで、実験的フラグメントスペクトルを調べて、かかる質量のフラグメントが存在するかを決定する。スコアは、各アミノ酸について生じさせ、該スコアを集めて、次の減算サイクルのための部分的配列のリストを得る。減算サイクルは、アミノ酸の質量の減算が -0.5 および 0.5 の間の差を残すまで繰り返され、その結果1以上の候補アミノ酸配列を得る。次いで、該フラグメントスペクトルを生成した候補配列に類似または同一のサブ配列を有する蛋白質を同定する試みにおいて、高スコアの候補配列を既知蛋白質配列のライブラリー中の配列と比較する。

ある意味で有用ではあるが、フラグメンテーションスペクトルに基づく候補アミノ酸配列を仮定することに関連した問題点がある。フラグメンテーションスペクトルの解釈は、時間がかかり、質量分析法での高価な経験を有する少数の実験室においてのみ一般的に行うことができ、高度に技術的であり、しばしば不正確である。ヒトの解釈は比較的遅く、高度に主観的であり得る。さらに、ペプチド質量マッピングに基づく方法は、特異的で既知の蛋白質分解的な切断によって生成した完全な均一ペプチドから由来するペプチド質量に限定され、かくして、ペプチドの混合物には一般的に適用できない。

Yates、IIIらに対する米国特許第5,538,897号は、未知ペプチドのフラグメンテーションスペクトルと、未知ペプチドのアミノ酸配列を記載ペプチドのものに適合させるためのデータベースに蓄積された記載ペプチド配列から計算された理論的スペクトルとを対応させる方法を提供する。例えば、蛋白質配列ライブラリー中の既知のアミノ酸配列を用いて、1以上の候補フラグメントスペクトルを計算または予測できる。次いで、予測フラグメントスペクトルを未知

蛋白質の実験

的に得られたフラグメントスペクトルと比較して、最良の適合または複数の適合を決定する。好ましくは、未知ペプチドの質量は既知である。蛋白質配列ライブラリーにおける様々な配列のサブ配列を分析して、フラグメンテーションスペクトルにおける親ペプチドの質量の所与の許容度に等しいまたは内にある質量を有するペプチドに対応したそれらのサブ配列を同定する。適当な質量を有する各サブ配列では、予測フラグメントスペクトルは、候補ペプチドの様々なアミノ酸サブセットの質量を計算することによって計算できる。その結果、各々が予測フラグメントスペクトルを有する複数の候補ペプチドが得られる。次いで、予測フラグメントスペクトルを未知蛋白質について実験的に得られたフラグメントスペクトルと比較して、実験由来のフラグメントスペクトルを生じるペプチドの配列に同一であるようなサブ配列を有する1以上の蛋白質を同定する。しかしながら、この技術は、かかるデータベース中に事前記載されたまたは含まれるものと配列またはサブ配列同一性を有しない未知で新規の蛋白質またはペプチドの配列を誘導できず、かくして、新たな配列決定法ではない。

従って、質量分析法を用いたペプチドのアミノ酸配列を決定する真に新たな配列決定法に対する要望が依然として存在する。

発明の概要

本発明は、ペプチドのライブラリーを生成させる方法に指向され、ここに、ライブラリー中の各ペプチドは、同一の事前測定された分子量に対応する分子量を有する。次いで、典型的には、ペプチドの該ライブラリーを用いて、事前測定された分子量を有する未知ペプチドのアミノ酸配列を決定する。好ましくは、該ライブラリーを生成するのに用いた事前測定された分子量は、未知ペプチドの分子量である。最も好ましくは、未知ペプチドの分子量は、飛行時間型質量分析計のとき質量分析計を用いてライブラリーの生成に先立って測定される。

該ライブラリーは合成的であり、すなわち事前記載されなく、典型的には、未知ペプチドの事前測定した分子量に基づき、ペプチドが分析される各々の時間で生成される。該ライブラリーは、未知ペプチドに存在できる一組のアミノ酸の全

ての許

容された組合せを定義することによって生成され、ここに、各組合せの分子量を分子量を測定するために用いた装置の実験精度内で事前測定された分子量に対応させ、ペプチド結合形成において水損失およびプロトン付加をさせて、該組における各組合せのアミノ酸の一次配列のすべての可能な順列の許容されるライブラリーを生成する。

一般的に、本発明は、未知ペプチドのアミノ酸配列を決定する方法に指向され、それは、未知ペプチドについての分子量および実験的フラグメンテーションスペクトルを測定し、未知ペプチドの実験的フラグメンテーションスペクトルを、許容されたペプチドライブラリーが上記のタイプである許容された合成ペプチドライブラリーの各個々のメンバーについて計算された理論的フラグメンテーションスペクトルと比較し、未知ペプチドのフラグメンテーションスペクトルと最も厳密に適合する理論的フラグメンテーションスペクトルを有するペプチドライブラリーにおいてペプチドを同定し、それから、許容されたライブラリー中の該同定されたペプチドのアミノ酸配列が未知ペプチドのアミノ酸配列を表すことが推論されることを含む。

未知ペプチドの分子量は、当該技術分野において知られたいずれの手段によっても測定できるが、好ましくは質量分析計で測定される。アミノ酸の許容された組合せは、典型的には天然のアミノ酸、すなわち、トリプトファン、アルギニン、ヒスチジン、グルタミン酸、グルタミン、アスパラギン酸、ロイシン、トレオニン、プロリン、アラニン、チロシン、フェニルアラニン、メチオニン、リジン、スパラギン、イソロイシン、システイン、バリン、セリンおよびグリシンを含む一組の許容されたアミノ酸から選択するが、限定されるものではないが、非天然のアミノ酸および天然のアミノ酸の化学的に修飾された誘導体、例えばカルバミドシステインおよびデオキシメチオニンを含めた他のアミノ酸も含み得る。次いで、アミノ酸の許容された組合せは、この組のアミノ酸の1以上の個々のメンバーを用い計算し、各許容された組合せの総質量が未知ペプチドの事前測定された質量に対応するように、ペプチド結合形成と関連した既知の質量変化が、未知

ペプチドのこの分子量がそこまで計算される実験精度、典型的には約 30 ppm 内となるのを可能とする。該組の許容された組合せは、適当にプログラムされたコンピュータを用いて最も容易

に計算される。許容されたペプチドライブラリーは、各許容されたアミノ酸組成の全ての可能な直鎖状組合せにおける順列によって組み立てられ、適当にプログラムされたコンピュータを用いても最も容易に構築される。アミノ酸の組合せおよびペプチドのライブラリーに関する「許容された」なる用語とは、調査下の未知ペプチドに特異的な組合せまたはライブラリーをいうことに注意すべきである。ペプチドライブラリーは、今度は実験的に測定された分子量から計算されるアミノ酸組合せから構築される。異なる質量の未知ペプチドが調査されると、アミノ酸の異なる組合せが許容され、よってユニークな分子量の各未知ペプチドがユニークなペプチドライブラリーを生起させる。

本発明は、許容されたライブラリーを拘束し、すなわち、可能な配列数を限定する。本発明の最も広い態様において、この拘束は、その配列が決定されるべきペプチド、すなわち、未知ペプチドについての分子量を測定することによって達成される。

本発明の好ましい具体例より、例えば、未知ペプチドの実験的フラグメンテーションスペクトルから入手可能な情報を用いて、ペプチドライブラリー中のアミノ酸の可能な配列数をさらに拘束できる。また、例えば、分子量を決定するのに用いた質量スペクトルのインモニウム (immmonium) イオン領域を用いて、未知ペプチドに含まれたアミノ酸を同定できる。別法として、またはさらに、2つのN末端アミノ酸は、 b_2/a_2 イオン対から同定できる。例えば、2つのN末端アミノ酸は、 b_2 および a_2 イオンの顕著なシグナルから推定できる。特に、該シグナルの同定は、修飾または非修飾のアミノ酸の全ての可能な組合せの質量を含むスペクトルの領域において、(COに対応する) 27.98 a.m.u.によって分離されたシグナルの認識によって決定できる。さらに、例えばパパイン、キモトリプシンまたはトリプシンのごときプロテアーゼでの酵素処理の使用に基づいて、スペクトル中のいずれかのペプチドのC末端残基は、アルギニンまた

はリジンのいずれかと決定され、これは、各々、175、11および147、11のシグナルの認識から確認または同定できる。別法として、塩基性アミノ酸を含むC末端は、予測y_iイオンの認識によって同定できる。該スペクトルを解釈して、次のアミノ酸を同定できる。

アミノ酸の許容されたライブラリーの拘束を適用するもう一つの手段は、例えば、質量測定の適当な定義された精度でyシリーズのイオンを同定することによって部分的な内部配列情報を得ることである。特に、コンピュータープログラムを用いて、全ての可能な修飾または非修飾のアミノ酸残基の質量によって分離された少なくとも3つの配列シグナルを認識できる。これらのシグナル間の差は、2つのアミノ酸の配列の同定を可能とする。最も好ましくは、未知ペプチドの分子量および例えば、上記に与えられたとき少なくとも一つの他の実験的パラメーターは、許容されたペプチドのライブラリーを最初に生成させることにおいて拘束として用いられる。

理論的フラグメンテーションスペクトルが、許容されたライブラリー中のすべてのペプチドについてそれから計算されるフラグメンテーションプロセスの特性は、質量スペクトルまたはプロテアーゼフラグメンテーションスペクトルもしくは化学的フラグメンテーションスペクトルのとき当該技術分野において知られたいずれのタイプでもあり得る。好ましくは、未知ペプチドの分子量およびフラグメンテーションスペクトルの双方は、タンデム質量分析計から得られる。未知ペプチドの実験的フラグメンテーションスペクトルに最もフィットする計算されたフラグメンテーションスペクトルを有するペプチドの許容されたライブラリーからの該ペプチドのアミノ酸配列は、未知ペプチドのアミノ酸配列に対応する。

必要がないけれども、実験的フラグメンテーションスペクトルは一般的に正規化される。また、次いで、未知ペプチドの実験的フラグメンテーションスペクトルとペプチドライブラリー用に計算された理論的フラグメンテーションスペクトルの各々との間の適合近接性 (c l o s e n e s s - o f - f i t) の示度である因子を計算して、理論的フラグメンテーションスペクトルのうちいずれが実験的フラグメンテーションスペクトルに最もフィットするかどうかを決定できる。

好ましくは、適合近接性の示度を計算する場合に、事前測定された閾値より大きな強度を有するフラグメンテーションスペクトルにおけるピーク値が選択される。実験的フラグメンテーションスペクトルが最良にフィットする理論的フラグメンテーションスペクトルは、未知ペプチドのものと適合する許容されたライブラリー中のアミノ酸配列に対応する。

図面の簡単な記載

図 1 は、本発明の方法の流れ図である。

図 2 a および図 2 b は、本発明の別法の好ましい具体例の流れ図である。

図 3 は、未知ペプチド X の分子量を決定するために用いた実験的質量スペクトルである。

図 4 は、図 3 に示された質量スペクトルのインモニウムイオン領域であって、未知ペプチド X に含まれたアミノ酸を同定する。

図 5 は、ペプチド X の実験的フラグメンテーション質量スペクトルである。

図 6 は、ペプチド Y の分子量を決定するために用いた実験的質量スペクトルである。

図 7 は、図 6 に示された質量スペクトルのインモニウムイオン領域であって、ペプチド Y に含まれたアミノ酸を同定する。

図 8 は、ペプチド Y の実験的タンデム質量スペクトルである。

図 9 は、ペプチド Z の分子量を決定するために用いた実験的質量スペクトルである。

図 10 は、図 9 に示された質量スペクトルのインモニウムイオン領域であって、ペプチド Z に含まれたアミノ酸を同定する。

図 11 は、ペプチド Z の実験的タンデム質量スペクトルである。

発明の詳細な記載

本発明は、いずれの実験的に決定されたペプチドまたはヌクレオチド配列も参照することなく、およびエドマン分解プロセスまたは通常の質量分析のフラグメンテーションパターンのごとき個々のアミノ酸残基の連続的および段階的な同定および順序付けに頼ることなく、未知ペプチドの配列を決定する新たな方法に指

向される。本発明の方法において、理論的ペプチド配列のライブラリーは、事前測定された分子量、好ましくは、未知ペプチドの実験的に測定された分子量から生成される。それ自体、このライブラリーは、未知ペプチドのアミノ酸配列ならびに事前測定され

た分子量を有するいずれかの他のペプチドのそれを含まねばならない。未知の正確なアミノ酸配列は、標準的相関関数を適用して、その計算された、すなわち理論的な、フラグメンテーションスペクトルが未知のフラグメンテーションパターンに最も厳密に適合する合成ライブラリーからのそのペプチドを選択することによって同定される。好ましい具体例において、フラグメンテーションスペクトルは、質量スペクトルであって、相関方法は、米国特許第5,538,897号（ここにそのすべてを出典明示して本明細書の一部とみなす）に記載された関数である。好ましくは、理論的フラグメンテーションスペクトルが生成され、適当にプログラムされたコンピューターを用いて未知のフラグメンテーションパターンに適合させる。

本発明は、図1に供された流れ図を参照してより良く理解できる。該ペプチドが蛋白質または大きなポリペプチドである場合、該蛋白質または大きなポリペプチドを切断して、当該技術分野においてよく知られた手段によってペプチドプールを形成できる。次いで、該未知ペプチド（「ペプチドX」）をHPLCまたは当業者に知られたいずれの手段、好ましくは質量分析法によってプールから分離し、ペプチドXの分子量を測定する。ペプチドXの分子量を測定するための多数の方法があるが、好ましい方法は再び質量分析法である。

次いで、理論または実験結果が教示する一組のアミノ酸をペプチドXに含ませることができ、ペプチドXの配列を決定するのを考慮するために定義する。アミノ酸の定義された組は、天然のアミノ酸に加えて修飾のまたは非天然のアミノ酸を含み得る。

典型的には、本発明の方法は、アミノ酸配列を決定する場合に「裸の（naked）」ペプチドを必要とする。従って、該ペプチドは、あるアミノ酸の側鎖への炭水化物の結合を含む例えば、グリコシル化のごとき翻訳後修飾によって共有

結合的に修飾されるいずれの個々のアミノ酸もないべきである。本発明の方法を用いて翻訳後修飾されたペプチドのアミノ酸配列を決定する場合、該修飾は、典型的には、分析に先立って該ペプチドから除去し、ペプチドを本来のものにさせるように注意する。ペプチドから翻訳後修飾を除去する方法は、当該技術分野でよく知られ、例えば、ペプチド-N-グリコシダーゼF (PNGase F)、エンドグリコシダー

ゼ、エキソグリコシダーゼの混合物等のごとき酵素でのN-結合した炭水化物の除去、およびホスファターゼでのリン酸修飾の除去を含む。さらに、ペプチドで偶然に見出された修飾を除去する他の技術は、当該技術分野でよく知られている。しかしながら、特定のアミノ酸に対する特異的な修飾が未知ペプチド中に存在することが知られている場合、理論的または実験的結果が教示する定義された組のアミノ酸に含み得る修飾アミノ酸は、ペプチドXにおいて含み得て、かくして、修飾ペプチドを含有するペプチドの配列は、本発明の方法で決定できる。

ペプチドXの測定された質量に等しい総質量を有するアミノ酸の全ての組合せが計算され、ペプチド結合、プロトン付加等を決定することにおいて水損失を可能とする。いずれの個々のアミノ酸も、ペプチドXについて測定された質量と一致する量までいずれかの積分化学量論における、いずれかの所与の組合せの一部として含むことができる。これらの組合せは、ペプチドXについてのアミノ酸組合せの許容された組合せの全てを含み、従って、ペプチドXの実際のアミノ酸の組成物は、これらの組合せの1つおよび1つのみで表されるであろう。さらに、これらの組合せは、一般的にペプチド特異的である。

次いで、直鎖状ペプチドの許容されたライブラリーは、アミノ酸の許容された組合せから構築される。許容されたライブラリーは、各組合せにおける全アミノ酸を用いて、各組合せにおけるアミノ酸の配列の全ての可能な直鎖状順列を生成することによって構築される。許容されたライブラリーは、該アミノ酸のすべてのかかる順列を含み、従ってペプチドXを含むにちがいない。ペプチドXと同一の分子量を有するペプチドの許容されたライブラリーは、典型的には、配列決定された各々の新しい未知ペプチドについて、独立して、最初から構築される。す

なわち、新しいライブラリーは、典型的には、各分析物の一部として、およびその分析物のみのために構築される。しかしながら、当業者に明らかなように、一旦、所与の分子量を有する全ペプチドのライブラリーが構築されたならば、そのライブラリーは、その特定の分子量のいずれの他のペプチドのアミノ酸配列の決定にも用いることができる。

これは、実験的に測定された配列の利用性に基づき定期的な更新および改善に付

される未知配列の単一データベースを全ての分析物に用いる、現存のデータベースアプローチとは基本的に異なる。その結果、本発明の方法で、いずれの実験的に測定されたペプチド配列ライブラリーにおいても存在しない、新しい従前は未知のペプチド配列決定は、直接的なペプチド分析によって、段階的でないオペレーター非依存的自動プロセスにおいて可能である。さらに、本発明の方法は、通常の20個のアミノ酸またはそれらの通常の修飾に拘束されない。

好ましい具体例において、図2aに供された流れ図において示すごとく、ペプチドXに関連するさらなる情報を用いて、該ライブラリー中のアミノ酸の許容された組合せおよび/または許容されたペプチド配列を拘束する。ペプチドXに関連した有用な情報は、限定されるものではないが、部分的アミノ酸組成を含む。例えば、ペプチドXの質量を測定するために用いた質量スペクトルは、ペプチドXに存在する特異的アミノ酸を同定するために使用できるフラグメントを含み得る。あるアミノ酸がペプチドXに明確に存在することが知られている場合、アミノ酸が全ての組合せ中、かくして該ライブラリーに存在するすべてのペプチドにおいて存在することを要求することによって、許容された組合せおよび許容されたライブラリーに拘束が入れられる。

図2bは、1を超える拘束が、それにより可能な一次配列のライブラリーに載せられるシステムを説明する。例示によると、（精製されたかまたは混合物に存在するかを問わず）分析されるべき各ペプチドについて、（例えば、MALDI-MSによる）その質量に対する情報および（例えば、FSI-タンデムMSによる）それからのタンデム質量スペクトルを得る。次いで、タンデム質量スペク

トルは、自動的に解釈されて、未知ペプチドについてのある種の情報を得る。適当なソフトウェアは、可能な場合、自動的にタンデムMSスペクトルから以下の情報を評価する：

i. インモニウムイオン領域を解析することによる該ペプチドに含有されるアミノ酸に対する情報。

ii. b_2/a_2 イオン対を同定することによる2つのN末端アミノ酸の同定。

iii. トリプシンの使用に基づき、C末端残基はリジンまたはアルギニンでなければならない。これらは、該スペクトルおよび次のアミノ酸を見出すために解釈し

たスペクトルにおいて同定できる。

iv. 部分的な内部配列情報は、 ≤ 100 ppmでの質量測定の定義された精度でyシリーズのイオンを同定することによって得ることができる。

マニュアルのスペクトルの解釈の言及は、MedsihradsyおよびBurlingameのA Companion to Methods in Enzymology 6:284-303(1994)に提供されている。

次いで、再び、図1および2を参照して、好ましくは拘束された許容されたライブラリーは、ペプチドXについて得られた実験的フラグメンテーションパターンと比較される理論的フラグメンテーションパターンを生成するための基礎として用いられる。フラグメンテーションパターンは、当該技術分野において知られたいずれの適当な手段によっても得ることができる。好ましくは、フラグメンテーションパターンは質量スペクトルであり、理論的および実験的質量スペクトルに適合させるのに用いた方法は、米国特許第5,538,897号に開示されたものである。しかしながら、該フラグメントのHPLC分離に連結したプロテアーゼフラグメンテーションまたは化学的フラグメンテーションを、実験的フラグメンテーションパターンを得るのに用いることもできる。

好ましくは、ペプチドXのアミノ酸配列の決定において、ペプチドXの分子量は、高精度で、典型的には、約30 ppm（百万分率）内まで測定される。かかるスペクトルの例を図3に供し、ここに、ペプチドXの分子量が774.392

8ダルトンのピークから決定される。さらに、生じ得るペプチドXの部分的フラグメンテーションの結果、拘束されるべきペプチドライブラリーを可能として、ペプチドXに含まれるあるアミノ酸を同定するフラグメントも観察される。ペプチドXについての質量スペクトルのこの一部の例を図4に供する。

次いで、ペプチドXは、質量分析計において衝突誘導化解離に付される。次いで、親ペプチドおよびそのフラグメントは、フラグメント混合物中の各フラグメントについての強度またはカウントおよび質量電荷比、 m/z を供する第二質量分析計に導入される。各フラグメントイオンは、横座標値が m/z であって、縦座標値が強度である棒グラフにおいて表される。限定されるものではないが、三重-四重極型

質量分析計、フーリエ変換型サイクロトロン共鳴質量分析計、タンデム飛行時間型質量分析計および四重極型イオン捕捉質量分析計を含めた様々な質量分析計の型を用いることができる。

次いで、実験的フラグメントスペクトルは、許容されたライブラリーの配列について予測される質量スペクトルと比較して、実験的質量スペクトルに厳密に適合する1以上の予測質量スペクトルを同定する。許容されたライブラリーが、ペプチドXの総質量に対応するそれを有するアミノ酸配列の全順列を含むために、ペプチドXは、許容されたライブラリーにおいて表示されなければならない。

実験的フラグメンテーションスペクトルをまず正規化することを含む方法を使用することによって、予測フラグメンテーションスペクトルを得て、実験的フラグメンテーションスペクトルと比較できる。これは、実験的フラグメンテーションスペクトルを質量および強度のリストに変換することによって達成できる。ペプチドXのピーク値を取出し、残った強度値の平方根を計算し、100の最大値まで正規化する。200個の最大強度イオンを10個の質量領域に分割し、各領域内の最大強度を再び100個まで正規化する。いずれかの側のその隣接物の30ダルトン内の各イオンは、該イオンの強度またはその隣接物のそれよりも大きな強度値を与えられる。他の正規化方法を用いることができ、正規化することなく分析を行うことができる。しかしながら、一般に、正規化は好ましい。特に

、近い隣接物の強度値を推定するために、最大正規化値、強度イオン数、質量領域数およびウィンドウのサイズは、全て独立してより大きなまたはより小さな値に変更できる。

フラグメント質量スペクトルは、各候補配列について予測される。フラグメント質量スペクトルは、アミノ酸配列につきタイプbおよびyについてフラグメントイオン質量を計算することによって予測される。ペプチドが断片化されて、該荷電がN末端切断フラグメントに保持される場合、得られたイオンは、bタイプのイオンとして標識される。該荷電がcタイプの末端フラグメントに保持されるならば、yタイプイオンと標識される。タイプbイオンの質量は、アミノ酸質量を合計してプロトンの質量を加えることによって計算された。タイプyイオンの質量は、C末端からのアミノ酸の質量を合計して、最初のアミノ酸への水およびプロトンの質量を

加えることによって計算された。この方法において、各フラグメントについての m/z 値を計算することができる。

しかしながら、予測質量スペクトルを提供するためには、各フラグメントの強度値を割り当てることも必要である。理論的基礎に基づいて、各フラグメントの強度値を予測することがしばしば可能であるが、この手順は困難であって、以下の様式において強度を割り当てることが有用であることが判明した。50.0の値は、各bおよびyイオンに割り当てられる。フラグメントイオンのいずれかの側の1ダルトンの質量に、25.0の強度を割り当てる。10.0のピーク強度は、各bおよびyイオン位置の m/z 未満の質量ピーク17.0および18.0ダルトンにて割り当て、 NH_2 および H_2O 損失の双方について計算され、10.0のピーク強度は、各タイプbイオン位置未満の質量ピーク28.0ダルトンに割り当てられて、 CO 損失について計算する。

予測 m/z 値の計算および強度の割り当ての後、予測質量スペクトルおよび実験的に由来のフラグメントスペクトル間の適合近接性の尺度を計算することが好ましい。適合近接性を計算するための多数の方法が利用できる。例えば、ここで S_p として参照された予備的適合近接性スコアを計算し、最高スコアのアミノ酸

配列についての相関関数を計算することを含む2工程方法を用いることができる。好ましい具体例において、 S_p は、以下の式を用いて計算される：

$$S_p = (\sum i_n) * n_i^* (1+\beta)^*(1-\rho)/n_r \quad (1)$$

式中、 i_n は適合強度であり、 n_i は適合フラグメントイオン数であって、 β はタイプbおよびyイオン連続性であり、 ρ は予測配列におけるインモニウムイオンおよびそれらの各々のアミノ酸の存在であって、 n_r はフラグメントイオンの総数である。因子 β は、フラグメントイオンシリーズの連続性の数値を評価する。現在のタイプbまたはyイオンを直ちに予測するイオンについて、フラグメントイオン適合があるならば、 β は0.0の初期値から0.075分増加する。これは、タイプbおよびyイオンの連続したシリーズに適合するペプチドについての予備スコア (preliminary score) を増加させる、それは、同一タイプの拡張さ

れたシリーズのイオンがMS/MSスペクトルにおいてしばしば観察されるからである。因子 ρ は、質量スペクトルの低質量末端におけるインモニウムイオンの存在を評価する。

インモニウムイオンの検出を診断的に用いて、該配列中の特定のタイプのアミノ酸の存在を決定することができる。例えば、もし、インモニウムイオンが、40.0を超える正規化強度を持つ未知ペプチドの加工されたデータファイル中で、110.0、120.0、または136.0+1.0ダルトンにて存在し、それぞれ、ヒスチジン、フェニルアラニン、およびチロシンの存在を示すならば、評価される配列を該インモニウムイオンによって示されるアミノ酸の存在につき調べる。該ペプチドに対する予備スコア S_p は1~ ρ の因子によって増減し、ここに、 ρ は、その存在が低分子量領域に示される3つのアミノ酸それぞれのペナルティの合計である。個々の ρ それぞれは、対応する低分子量ピークがあり、かつ該アミノ酸が配列中に存在しなければ、-0.15の値を取り得、対応する低分子量ピークがあり、かつ該アミノ酸が配列中に存在するならば、+0.15の値を取り得、対応する低分子量ピークがなければ、0.0の値を取り得る。該総ペナルティは、3つ全ての低分子量ピークがスペクトル中に存在するが該配列中に

は存在しない場合の -0.45 から、3つ全ての低分子量ピークがスペクトル中に存在しかつ配列中に存在する場合の $+0.45$ までの範囲にあり得る。

予備的適合近接性スコア S_p の計算に続いて、最大 S_p スコアを有する予測質量スペクトルを相関関数を用いてさらなる解析のために選択する。さらなる解析のために選択された候補の予測質量スペクトルの数は、算術的リソースおよび可能な時間に大きく依存するであろう。

相関関数を計算する目的で、該実験的に誘導されたフラグメントスペクトルは、典型的には、 S_p を計算する前に採用される予備加工とは幾分異なったやり方で予備加工される。相関関数の目的で、前駆体イオンをスペクトルから除去し、該スペクトルを10区分に分割する。次いで、各区分のイオンを50.0に正規化する。次いで、区分正規化スペクトルを相関関数を計算するために用いる。該2つの関数間の個別の相関を：

$$R_t = \sum_{i=0}^{m-1} x_i y_i + \tau \quad (2)$$

として計算し得、ここに、 τ は遅れ値である。個別の相関定理は、2つの実関数 x および y が個別のフーリエ変換形態：

$$R_t = X_t Y_t^* \tau \quad (3)$$

[式中、 $X(t)$ および $Y(t)$ は $x(i)$ および $y(i)$ の個別のフーリエ変換形であり、 Y^* は複素共役 (complex conjugate) を意味する。]

の1要素であることを言明する。従って、相互相関を、高速フーリエ変換 (FFT) アルゴリズム、1の変換形と他方の複素共役との乗法、および得られた積の逆変換を用いる、2組のデータのフーリエ変換によって計算し得る。

該予測スペクトルならびに予備加工した未知スペクトルを4096データポイントにゼロパッド (zero-pad) する。何故ならば、MS/MSスペクトルは、相関定理に意図されるごとく、周期的でなく、FFTアルゴリズムは、 N が2の整数乗であることを要求し、それで、得られた末端効果 (end effect) を考慮する必要があるからである。各候補ペプチド配列に属する最終スコアは

、 $-75 < t < 75$ の範囲にわたり $R(0)$ 引く該相互相関関数の平均である。P o w e l l および H e i f t j e [A n a l . C h i m . A c t a , 100 : 313 - 327 (1978)] に記載されたこの修飾「相関パラメータ」は、丁度スペクトル相関係数 $R(0)$ に対してより良い識別を示す。生スコアを 1.0 に正規化する。好ましくは、当該出力は該正規化された生スコア、該候補ペプチド質量、該非正規化相関係数、該予備スコア、該フラグメントイオン連続性 β 、該イオンモニウムイオン因子 τ 、フラグメントイオンの総数からの適合したタイプ b および y イオンの数、それらの適合した強度、タンパク質アクセス番号、および候補ペプチド配列を含む。

該相関関数を用いて、該実験的に誘導されたフラグメントスペクトルに対応する予測質量スペクトルの一つを自動的に選択し得る。好ましくは、しかしながら、該ライブラリーから多数の配列を出力し、単一の配列の最終選択を熟練したオペレータが行う。

計算および入手可能な時間源 (t i m e r e s o u r c e) に依存して、データ削減技術を採用することが有利であろう。好ましくは、これらの技術は、該スペクトル中の最も有益なイオンを強調しつつ、過度に検索速度に影響しない。一つの技術は、ペプチドにつき 3,000 程度の多くのフラグメントイオンを含有するであろう MS/MS スペクトル中のいくつかのフラグメントイオンのみを考慮することを含む。一つのデータ削減方針によると、該イオンを強度によってランク付けし、最も強いイオンのいくつかのフラクションを比較に用いる。もう一つの方法は、該スペクトルを、例えば約 5 つの少数の領域に小分けし、各領域における 50 最強イオンをデータセットの一部として用いることを含む。さらにもう一つの方法は、それらのイオンが配列イオンである確率に基づきイオンを選択することを含む。例えば、57 ないし 186 ダルトンの質量ウィンドウ、すなわち、タイプ b または y イオンの診断特性を含有するグリシンからトリプトファンまでの 20 個の普通のアミノ酸につきアンモニアおよび水に対応する 17 または 18 ダルトンの損失、または CO に対応する 28 ダルトンの損失のごとき減分の範囲内に存在するイオンを選択し得るであろう。

数多くの異なるスコアリングアルゴリズムを用いて、予備的適合近接性または相関を決定し得る。スコアリングが適合したイオンに強度の合計を乗じた数に基づくことに加えて、スコアリングは、該スペクトル中の配列イオンによって表わされる連続配列適用範囲の割合に基づき得る。例えば、10残基ペプチドは、潜在的に、9つのbおよびyタイプの配列イオンの各々を含有する。イオンの組がB₁からB₉まで及べば、100のスコアが与えられるが、例えばB₉イオンの欠損のとき該配列の途中に不連続が見出されれば、ペナルティが課せられる。最大スコアは、bおよびyの両方向に連続イオン系列を含有するアミノ酸に対して与えられる。

記載のスコアリング手順が、解を描かない場合には、スペクトル比較のためのさらなる技術を用い得、その技術において、分子量値および削減したフラグメントイオンの組で、該データベースを最初に検索する。該データベースの初期フィルタリングは、配列イオンを適合させ、上記の方法の一つでスコアを生成させることによって行われる。次いで、得られた解の組は、修飾完全MS/MSスペクトルを用いた

より厳密な検査プロセスを受ける。

第2段階の解析に関し、スペクトルライブラリー検索用に開発されたいくつかのスペクトル適合化方法の一つを用いる。これは、該ペプチド配列の「ライブラリースペクトル」を生成することを要求し、そのアミノ酸配列に関して予測した配列イオンに基づく。該「ライブラリースペクトル」の配列イオンの強度値を、該実験スペクトルから得る。もし、フラグメントイオンがm/z 256にあると予測したならば、該実験スペクトル中のm/z 256にあるイオンの強度値を該予測スペクトル中のイオンの強度として用いる。かくして、もし該予測スペクトルが「未知」のスペクトルと同一であれば、それは理想スペクトルを表わすであろう。次いで、該スペクトルを相関関数を用いて比較する。一般に、上記方法の計算時間の大部分は反復性検索プロセスにおいて費やされていると信じられている。該データベースを一回通過させた複数のMS/MSスペクトルの解析を乗ずることによって、効率の総合的な改善が現実化されるであろう。さらに、初期の

予備フィルタリングに用いた質量許容誤差は、引き続くステップで解析するための配列数を増減させることによって検索時間に影響し得る。

検索をスピードアップするためのもう一つの方法は、当該ピークが特定の閾値を上回るかどうかに基づき、全ての質量において該質量スペクトルをピーク/ノーピークとしてコード化する2値エンクリプションを含む。もし、タンパク質配列ライブラリーの集中的な使用を意図すれば、事前測定された質量範囲内の全てのサブ配列の予測質量値を計算し、貯蔵することが可能であり、少なくともいくつかの解析は、計算ではなく表を調べて行い得る。

実施例

以下の非限定的実施例は、単に本発明の好ましい具体例の例示であり、添付の請求の範囲によって範囲が定義される本発明を限定するものと解釈されるべきではない。

実施例 1

未知ペプチドXのアミノ酸配列を本発明の方法を用いて決定する。マトリクス-アシスティドレーザーデスクリプション(matrix-assisted laser-desorption)飛行時間質量分析計(Voyager Elite、Perspective Biosystems製)を遅延抽出(delayed extraction)およびポストソースディケイ(post source decay)で用いて、先ず、ペプチドXの分子量を決定する。図3に示すごとく、ペプチドX形態のプロトン付加体の質量は774.3928ダルトンであり、ペプチドXの質量は773.3928ダルトンであることを示す。

次いで、該解析において考慮すべき事項として、おそらくペプチドXの一部であるアミノ酸の組を限定する。ペプチド結合形成の間に失われた水1分子の質量だけ少ないアミノ酸の各々の分子量を有する限定されたアミノ酸の組を以下に示す。分子量の単位は、ダルトンまたはa.m.u.である。

トリプトファン	= 186.079313	カルバミドシステイン	= 160.03065
アルギニン	= 156.10111	フェニルアラニン	= 147.068414
ヒスチジン	= 137.058912	メチオニン	= 131.04085
グルタミン酸	= 129.042593	リジン	= 128.094963
グルタミン	= 128.058577	アスパラギン	= 114.042927
アスパラギン酸	= 115.026943	イソロイシン	= 113.084064
ロイシン	= 113.084064	システイン	= 103.009185
トレオニン	= 101.047678	バリン	= 99.068414
プロリン	= 97.052764	セリン	= 87.032028
アラニン	= 71.037114	グリシン	= 57.021464
チロシン	= 163.063328		

ペプチドXに対して許容されたアミノ酸の組合わせは、上記のごとく、先ず、30 ppm（百万分率）の実験精度まで測定することによって、ペプチドの分子量を決定する。従って、当該許容されたライブラリー中のアミノ酸の各許容された組合

せは、 773.3928 ± 30 ppmの総質量を有する。ペプチドXの分子量を与えることに加えて、最初の質量スペクトルは、また、ペプチドX中の特定のアミノ酸の存在も裏付ける。これらのアミノ酸の存在を示すこの質量スペクトルのインモニウム領域を図4に示す。特に、該スペクトルのインモニウム領域は、174.988の特徴的な質量を持つアルギニン、85.8851に特徴的な質量を持つロイシン/イソロイシン（これらは同一の質量を有し、従って、質量分析のみでは区別できない）、109.823に特徴的な質量を持つヒスチジン、および135.915に特徴的な質量を持つチロシンの存在を示す。従って、該許容されたライブラリーがアルギニン、ロイシン/イソロイシン、ヒスチジン、およびチロシンを含有し、 773.3928 ± 30 ppmの総分子量を有する組に拘束することが可能であった。

総分子量が 773.3928 ± 30 ppmの総分子量を有するアミノ酸の組を決定するために、以下の数式を適用した：

$$MM_1 = \Sigma (\text{ヒスチジン}) + (\text{チロシン}) + (\text{ロイシン/イソロイシン}) + \\ (\text{アルギニン}) + (\text{H}_2\text{O}) + (aa_1) + \dots + (aa_n)$$

ここに、 $aa_1 + \dots + aa_n$ は、アルギニン、イソロイシン、ヒスチジン、およびチロシン以外の許容されたアミノ酸のいずれかである。 $773.3928 \pm 30 \text{ ppm}$ の分子量を有し得る最適なアミノ酸の組は以下である：

- 1) トリプトファン、アルギニン、ロイシン/イソロイシン、ヒスチジン、およびチロシン
- 2) グルタミン酸、グリシン、アルギニン、ロイシン/イソロイシン、ヒスチジン、およびチロシン
- 3) アラニン、アスパラギン酸、アルギニン、ロイシン/イソロイシン、ヒスチジン、およびチロシン

これらの組合せがペプチドに対して許容されたアミノ酸の組を構成する。

さらに、ペプチドXをトリプシン切断によって得、従って、トリプシンの認められている特異性から、ペプチドXは、そのカルボキシル末端アミノ酸として、リジンまたはアルギニンも有しているはずである。この拘束により、許容された直鎖状ペプチドライブラリーは、組合せ1、2および3の全ての個々の直列順列から構成

された。該許容されたライブラリーは528の直鎖状ペプチド、イソロイシンを含有する264個のペプチドの1組（以下に示す）、およびイソロイシンをロイシンで置換した264個のペプチドの対応する組（示さず）を含む。

1) YIHWR	54) HIYGER	107) HGYEIR	160) DYHLAR	213) IADYHR
2) IYHWR	55) YIGHER	108) GHYEIR	161) HDYIAR	214) AIDYHR
3) YHIWR	56) IYGHER	109) YEGHIR	162) DHYIAR	215) DAIFYHR
4) HYTWR	57) YGIHER	110) EYGHIR	163) IHDYAR	216) ADIFYHR
5) IHYWR	58) GYIHER	111) YGEHIR	164) HIDYAR	217) YHDAIR
6) HIYWR	59) IGYHER	112) GYEHIR	165) IDHYAR	218) HYDAIR
7) YTWHR	60) GIYHER	113) EGYHIR	166) DIHYAR	219) YDHAIR
8) IYWHR	61) YHGIER	114) GEYHIR	167) HDIYAR	220) DYHAIR
9) YWIHR	62) HYGIER	115) HEGYIR	168) DHIYAR	221) HDYAIR
10) WYIHR	63) YGHIER	116) EHG YIR	169) YIHADR	222) DHYAIR
11) IWYHR	64) GYHIER	117) HGEYIR	170) IYHADR	223) YHADIR
12) WIYHR	65) HGYIER	118) GHEYIR	171) YHIADR	224) HYADIR
13) YHWIR	66) GHYIER	119) EGHYIR	172) HYIADR	225) YAHDIR
14) HYWIR	67) IHGYER	120) GEHYIR	173) IHYADR	226) AYHDIR
15) YWHIR	68) HIGYER	121) IHEGYR	174) HIYADR	227) HAYDIR
16) WYHIR	69) IGHYER	122) HIEGYR	175) YIAHDR	228) AHYDIR
17) HWYIR	70) GHIYER	123) IEHGYR	176) IYAHDR	229) YDAHIR
18) WHYIR	71) HGIYER	124) EIHGYR	177) YAIHDR	230) DYAHIR
19) IHWYR	72) GHIYER	125) HEIGYR	178) AYIHDR	231) YADHIR
20) HIWYR	73) YIEGHR	126) EHIGYR	179) IAYHDR	232) AYDHIR
21) IWHYR	74) IYEGHR	127) IHGEYR	180) AIYHDR	233) DAYHIR
22) WIHYR	75) YEIGHR	128) HIGEYR	181) YHAIDR	234) ADYHIR
23) HWTYR	76) EYIGHR	129) IGHEYR	182) HYAIDR	235) HDAYIR
24) WHIYR	77) IEYGHR	130) GIHEYR	183) YAHIDR	236) DHAYIR
25) YIHEGR	78) EITYGHR	131) HGIEYR	184) AYHIDR	237) HADYIR
26) IYHEGR	79) YIGEHR	132) GHIEYR	185) HAYIDR	238) AHDYIR
27) YHIEGR	80) IYGEHR	133) IEGHYR	186) AHYIDR	239) DAHYIR
28) HYEGR	81) YGIEHR	134) EIGHYR	187) IHAYDR	240) ADHYIR
29) IHYEGR	82) GYIEHR	135) IGEHYR	188) HIA YDR	241) IHDAYR

30) HIYEGR	83) IGYEHR	136) GIEHYR	189) IAHYDR	242) HIDAYR
31) YIEHGR	84) GIYEHR	137) EGIHYR	190) AIHYDR	243) IDHAYR
32) IYEHGR	85) YEGIHR	138) GEIHYR	191) HAIYDR	244) DIHAYR
33) YEHGR	86) EYGIHR	139) HEGIYR	192) AHIYDR	245) HDIAYR
34) EYIHGR	87) YGEIHR	140) EHGIYR	193) YIDAGR	246) DHIAYR
35) IEYHGR	88) GYEIHR	141) HGEIYR	194) IYDAHR	247) IHADYR
36) EYHGR	89) EGYIHR	142) GHEIYR	195) YDIAHR	248) HDIAYR
37) YHEIGR	90) GEYIHR	143) EGHIYR	196) DYIAHR	249) IAHYDR
38) HYEIGR	91) IEGYHR	144) GEHIYR	197) IDYAGR	250) AIHDYR
39) YEHIGR	92) EIGYHR	145) YIHDA	198) DIYAGR	251) HADYR
40) EYHIGR	93) IGEYHR	146) IYHDA	199) YIADHR	252) AHIDYR
41) HEYIGR	94) GIEYHR	147) YHIDA	200) IYADHR	253) IDAHYR
42) EHYIGR	55) EGIYHR	148) HYIDA	201) YAIHDR	254) DIAHYR
43) IHEYGR	96) GEIYHR	149) IHYDA	202) AYIDHR	255) IADHYR
44) HIEYGR	97) YHEGIR	150) HIYDA	203) IAYDHR	256) AIDHYR
45) IEHYGR	98) HYEGIR	151) YIDHAR	204) AIYDHR	257) DAHYR
46) EIHYGR	99) YEHGIR	152) IYDHAR	205) YDAIHR	258) ADHYR
47) HEIYGR	100) EYHGIR	153) YDIHAR	206) DYAIHR	259) HDIAYR
48) EHIYGR	101) HEYGIR	154) DYIHAR	207) YADIHR	260) HADYR
49) YIHGER	102) EHYGIR	155) IDYHAR	208) AYDIHR	261) HADYR
50) IYHGER	103) YHGEIR	156) DIYHAR	209) DAYIHR	262) AHDYR
51) YHIGER	104) HYGEIR	157) YHDIAR	210) ADYIHR	263) DAHYR
52) HYIGER	105) YGHEIR	158) HYDIAR	211) IDAYHR	264) ADHYR
53) IHYGER	106) GYHEIR	159) YDHIAR	212) DIAYHR	

次いで、米国特許第5,538,897号の方法を用いてペプチドXをMS/M
Sによってこのライブラリーに適合させた。ペプチドXの実験タンデム質量スペ
クトルを図5に示し、このスペクトルに適合する10個のトップランキングのペ
プチドを以下に示す。ペプチドXの配列は、トップにランクされたペプチド、A
H Y D I Rのものであることが決定された。

ランク/S p	(M+H)	C n C * 1 0 ^ 4	S P	イオン	参照	ペプチド
1/1	774.9	1.0000	1.8118	491.0	11/15	p(228) (-)AHYDIR
2/3	774.9	0.9308	1.6864	386.2	10/15	p(238) (-)AHDYIR
3/2	774.9	0.8012	1.4516	414.3	10/15	p(227) (-)HAYDIR
4/5	774.9	0.7319	1.3262	320.5	9/15	p(237) (-)HADYIR
5/1	774.9	0.7168	1.2987	491.0	11/15	p(186) (-)AHYTDR
6/12	774.9	0.6131	1.1108	248.3	9/15	p(226) (-)AYHDIR
7/3	774.9	0.6033	1.0930	386.2	10/15	p(192) (-)AHYDR
8/9	774.9	0.5878	1.0651	264.1	9/15	p(225) (-)YAHDIR
9/50	774.9	0.5850	1.0599	156.5	7/15	p(219) (-)YDHAIR
10/14	774.9	0.5825	1.0553	247.9	9/15	p(217) (-)YHDAIR

実施例 2

既知の標準ペプチドであるペプチドYのアミノ酸配列を、実施例1のペプチドXに適用したごとく本発明の方法を用いて決定した。ペプチドYは、以下のアミノ酸配列：YGGFIRRを有する。ペプチドYの分子量は、図6に示す質量スペクトルから、実験精度30ppmで868.4719と測定された。1296.6854および1570.6774における質量は、測定装置を校正するように添加した内部標準由来のものである。

次いで、該解析において考慮すべき事項として、おそらくペプチドYの一部であるアミノ酸の組を限定する。ペプチド結合形成の間に失われた水1分子の質量だけ少ないアミノ酸の各々の分子量を有する限定されたアミノ酸の組は実施例1で用いたものと同一である。

ペプチドYの質量は、±30ppmの実験精度で868.4719であると測定

されたので、従って、各許容されたアミノ酸の組合せは、868.4719±30ppmに等しい総質量を有する。さらに、図7に示す、図6からのPSD痕跡のインモニウムイオン領域から、ペプチドYは以下のアミノ酸：136.027に特徴的な質量を持つチロシン、120.071に特徴的な質量を持つフェニルアラニン、175.00に特徴的な質量を持つアルギニン、および85.9225

に特徴的な質量を持つロイシン/イソロイシンも含有しているはずである。

実施例 1 の数式の適用は、以下のアミノ酸の組合せのみがペプチド Y に対して許容されることを示した：

- 1) チロシン、フェニルアラニン、アルギニン、アスパラギン、およびアルギニン
- 2) チロシン、フェニルアラニン、アルギニン、アルギニン、ロイシン/イソロイシン、グリシン、およびグリシン
- 3) チロシン、フェニルアラニン、アルギニン、ロイシン/イソロイシン、アラニン、アラニン、およびグルタミン
- 4) チロシン、フェニルアラニン、アルギニン、ロイシン/イソロイシン、グリシン、バリン、およびアスパラギン
- 5) チロシン、フェニルアラニン、アルギニン、ロイシン/イソロイシン、グリシン、グリシン、グリシン、およびバリン
- 6) チロシン、フェニルアラニン、アルギニン、ロイシン/イソロイシン、グリシン、アラニン、アラニン、およびアラニン

これらの組合せが、ペプチド Y に対して許容されたアミノ酸の組合せの組を構成する。

さらに、ペプチド Y をトリプシン切断によって得、従って、トリプシンの認められている特異性から、ペプチド Y は、そのカルボキシル末端アミノ酸として、リジンまたはアルギニンも有しているはずである。この拘束により、ペプチド Y に対して許容された直鎖状ペプチドライブラリーは、上記の組合せの全ての個々の直鎖状順列から構成された。該許容されたライブラリーは 20,000 を超えるペプチドを含み、かくして、示さない。

実施例 1 と同様に、次いで、米国特許第 5,538,897 号の方法を用いて、タンデム質量スペクトル分析によってペプチド Y をこのライブラリーに適合させた。ペプチド Y の実験タンデム質量スペクトルを図 8 に示し、このスペクトルに適合するトップ 10 にランクされるペプチドを以下に示す。これら 10 のうち、トップにランクされるペプチド、YGGFIRR はペプチド Y として知られてい

る。

ランク/S p	(M+H)	C n	C ⁴	S P	イオン	参照	ペプチド
1/3	868.	51.000	1.894	376.6	11/24	p(415)	(-)YGGFFIR
2/1	868.5	0.967	1.831	440.4	11/24	p(298)	(-)YGGRIFR
3/15	868.5	0.966	1.830	322.8	11/28	p(1975)	(-)YGGFIGVR
4/15	868.5	0.965	1.828	322.8	11/28	p(1735)	(-)YGGFIVGR
5/5	868.5	0.961	1.821	361.7	11/24	p(454)	(-)YGGRFIR
6/2	868.5	0.960	1.819	408.0	11/24	p(1311)	(-)YGVNIFR
7/12	868.5	0.951	1.802	333.7	11/24	p(1527)	(-)YGVNFIR
8/8	868.5	0.942	1.783	356.9	11/28	p(2153)	(-)YGGGVIFR
9/13	868.5	0.937	1.775	331.0	11/24	p(394)	(-)YGGIFRR
10/8	868.5	0.935	1.771	356.9	11/28	p(2147)	(-)YGGVGIFR

実施例 3

既知の標準ペプチドであるペプチドZのアミノ酸配列を、実施例1のペプチドXおよび実施例2のペプチドYに適用したごとく本発明の方法を用いて決定した。ペプチドZは、以下のアミノ酸配列：R P P G F S P F Rを有する。ペプチドZの分子量は、図9に示す質量スペクトルから、実験精度30 ppmで1060.5660と測定された。1181.6477、1296.6933および1570.6774における質量は、測定装置を校正するように添加した内部標準由来のものである。

次いで、該解析において考慮すべき事項として、おそらくZの一部であるアミノ酸の組を限定する。ペプチド結合形成の間に失われた水1分子の質量だけ少ないアミノ酸の各々の分子量を有する限定されたアミノ酸の組は実施例1および2で用い

たものと同一である。

ペプチドZの質量は、±30 ppmの実験精度で1060.5660であると測定されたので、従って、各許容されたアミノ酸の組合せは、合計で1060.5660±30 ppmに等しい質量を有するはずである。さらに、図10に示す、図9からのPSD痕跡のインモニウムイオン領域から、ペプチドZは以下のア

ミノ酸：120.20に特徴的な質量を持つフェニルアラニン、174.94に特徴的な質量を持つアルギニン、167.23の質量から推定されるプロリンと一緒にあったセリン、155.66の質量から推定されるプロリンと一緒にあったグリシンをも含有しているはずである。

実施例1の数式の適用を用いてペプチドZに対して許容されたアミノ酸の組合せを決定し、以下のアミノ酸の組合せのみがペプチドYに対して許容されることを示した：

PTIW + FRPSG	GAAAAR + FRPSG	GVVNK + FRPSG	AVVID + FRPSG
WIW + FRPSF	GPPVF + FRPSG	ASPKN + FRPSG	SPVVD + FRPSG
GQRR + FRPSG	GPVIM + FRPSG	GGAAIK + FRPSG	GVINN + FRPSG
ANRR + FRPSG	APVVM + FRPSG	GGGPTK + FRPSG	AVVNN + FRPSG
GOARR + FRPSG	AAIE + FRPSG	GGGVVK + FRPSG	GGGVIN + FRPSG
PPFR + FRPSG	GPTIE + FRPSG	GAAAVK + FRPSG	GAAAIN + FRPSG
PIMR + FRPSG	GVVIE + FRPSG	GGASFK + FRPSG	GGAWN + FRPSG
VIER + FRPSG	ASPIE + FRPSG	IQQQ + FRPSG	AAAAN + FRPSG
VNQR + FRPSG	APVTE + FRPSG	GAIQK + FRPSG	SSPII + FRPSG
CGVQR + FRPSG	AVVVE + FRPSG	AAVQQ + FRPSG	SPVTI + FRPSG
AAAQR + FRPSG	GSPKK + FRPSG	AAINQ + FRPSG	GGGGGVI + FRPSG
IIDR + FRPSG	IQQK + FRPSG	GVVNQ + FRPSG	GGGAAAI + FRPSG
INM + FRPSG	GAIQK + FRPSG	GGAAIQ + FRPSG	PPTTT + FRPSG
GGINR + FRPSG	AAVQK + FRPSG	GGGVVQ + FRPSG	PVVTT + FRPSG
GAVNR + FRPSG	GSPQK + FRPSG	AAAVQ + FRPSG	GGGGAVV + FRPSG
GGGGIR + FRPSG	AAINY + FRPSG	GVHD + FRPSG	GGAAAV + FRPSG
GGGAVR + FRPSG	GPTNK + FRPSG	APTID + FRPSG	AAAAAA + FRPSG

これらの組合せが、ペプチドZに対して許容されたアミノ酸の組合せの組を構成する。

さらに、ペプチドZをトリプシン切断によって得、従って、トリプシンの認められている特異性から、ペプチドZは、そのカルボキシル末端アミノ酸として、リジンまたはアルギニンも有しているはずである。この拘束により、ペプチドZに対して許容された直鎖状ペプチドライブラリーは、上記の組合せの全ての個々の直鎖状順列から構成された。該許容されたライブラリーは2,000,000を超えるペプチドを含み、かくして、示さない。

実施例 1 および 2 と同様に、次いで、米国特許第 5,538,897 号の方法を用いて、タンデム質量スペクトル分析によってペプチド Z をこのライブラリーに適合させた。ペプチド Z の実験タンデム質量スペクトルを図 11 に示し、このスペクトルに適合するトップ 10 にランクされるペプチドを以下に示す。これら 10 のうち、トップにランクされるペプチド、RPPGFSPFR はペプチド Z として知られている。

ランク/S p	(M+EI)	Cn	CA4	Sp	イオン	参照	ペプチド
1/1	1061.2	1.000	3.310	1163.5	19/24	p(135)	(-)RPPGFSPFR
2/2	1061.2	0.871	2.884	1126.6	19/24	p(120)	(-)RPPGFSPFR
3/5	1061.2	0.857	2.835	824.7	17/24	p(122)	(-)RPPGFSPFR
4/11	1061.2	0.849	2.811	692.8	16/24	p(164)	(-)RPPGFSPFR
5/4	1061.2	0.833	2.759	831.2	17/24	p(189)	(-)RPPGFSPFR
6/3	1061.2	0.831	2.749	872.9	17/24	p(131)	(-)RPPGFSPFR
7/6	1061.2	0.819	2.711	797.1	17/24	p(126)	(-)RPPGFSPFR
8/12	1061.2	0.806	2.668	674.0	16/24	p(100)	(-)RPPGFSPFR
9/13	1061.2	0.792	2.623	668.4	16/24	p(137)	(-)RPPGFSPFR
10/14	1061.2	0.782	2.588	656.5	16/24	p(138)	(-)RPPGFSPFR

本明細書に開示する本発明はよく計画されていて、上記の目的を満足することは明らかであるが、数値的な修飾および具体例は当業者によって工夫することができる。従って、添付した請求の範囲は、本発明の精神および範囲の内にある全てのそのような修飾および具体例を含む。

【 図 1 】

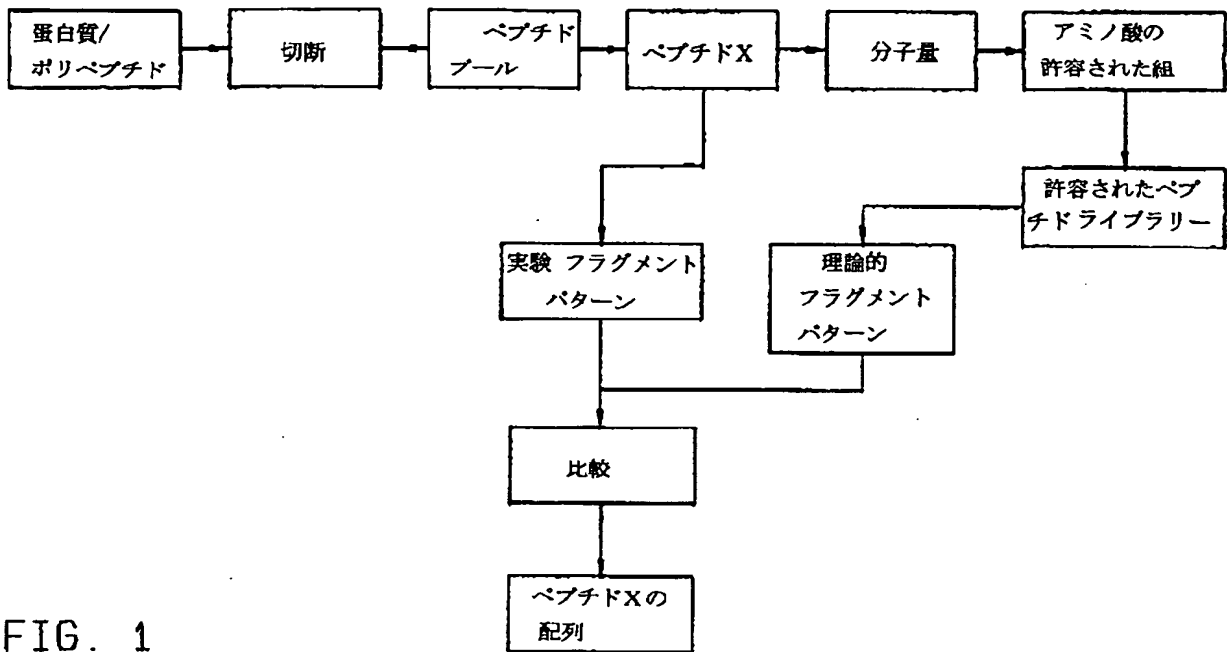


FIG. 1

【 図 2 A 】

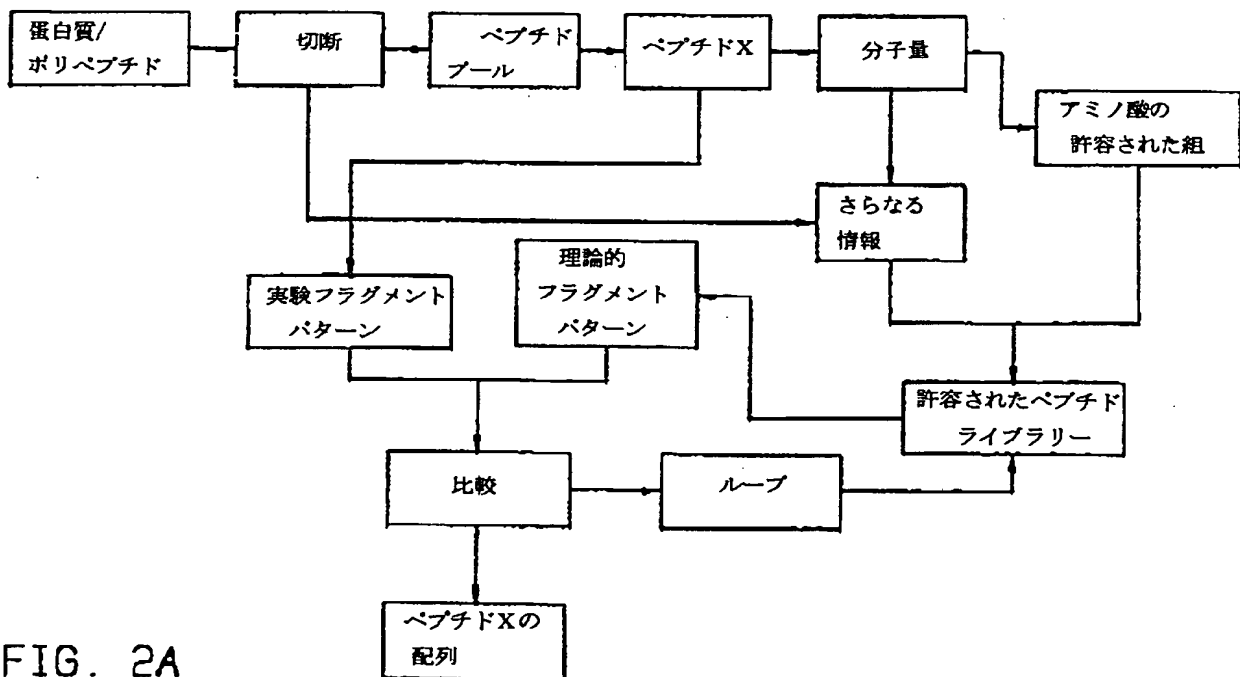


FIG. 2A

【 図 2 】

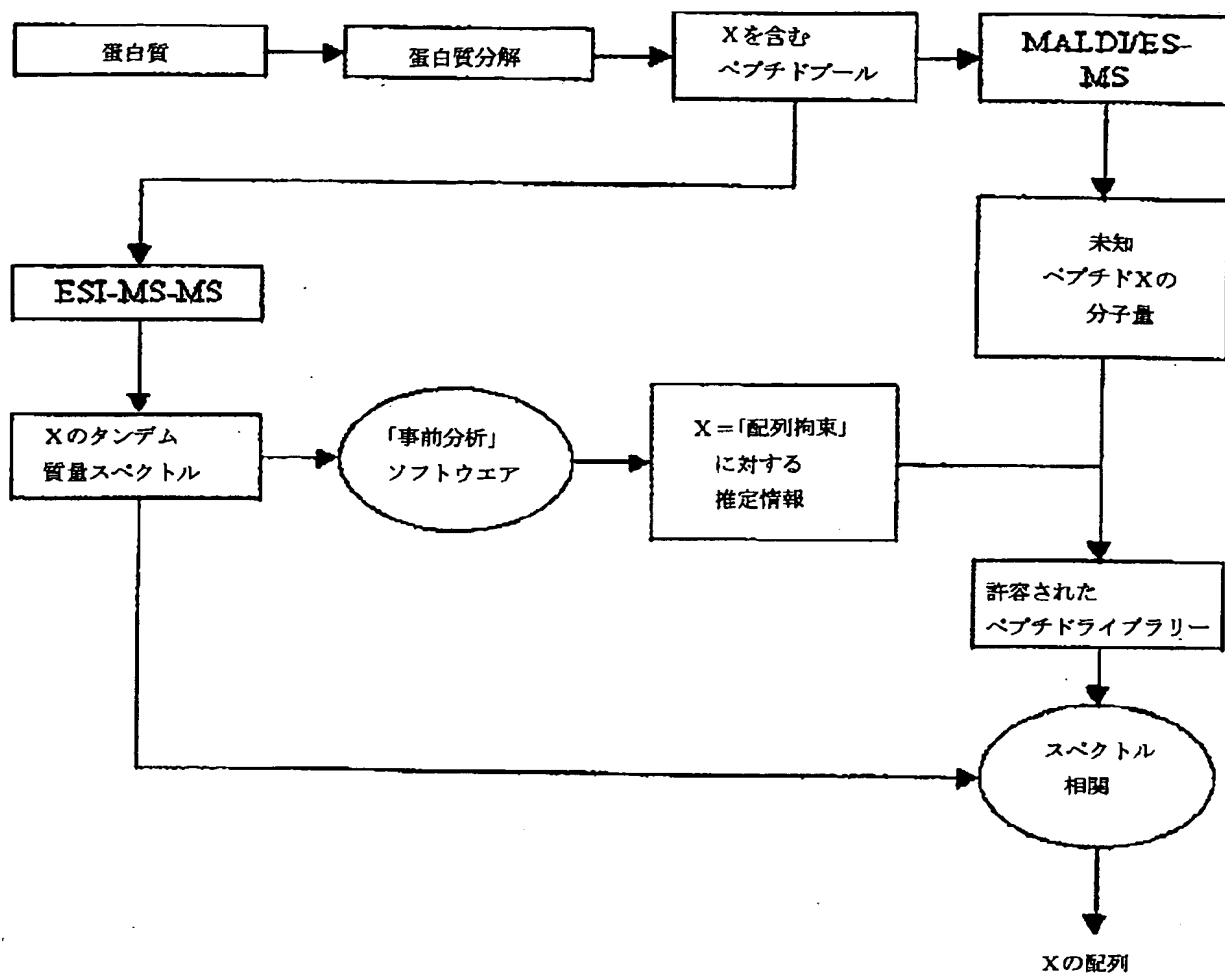


FIG. 2B

【 図 3 】

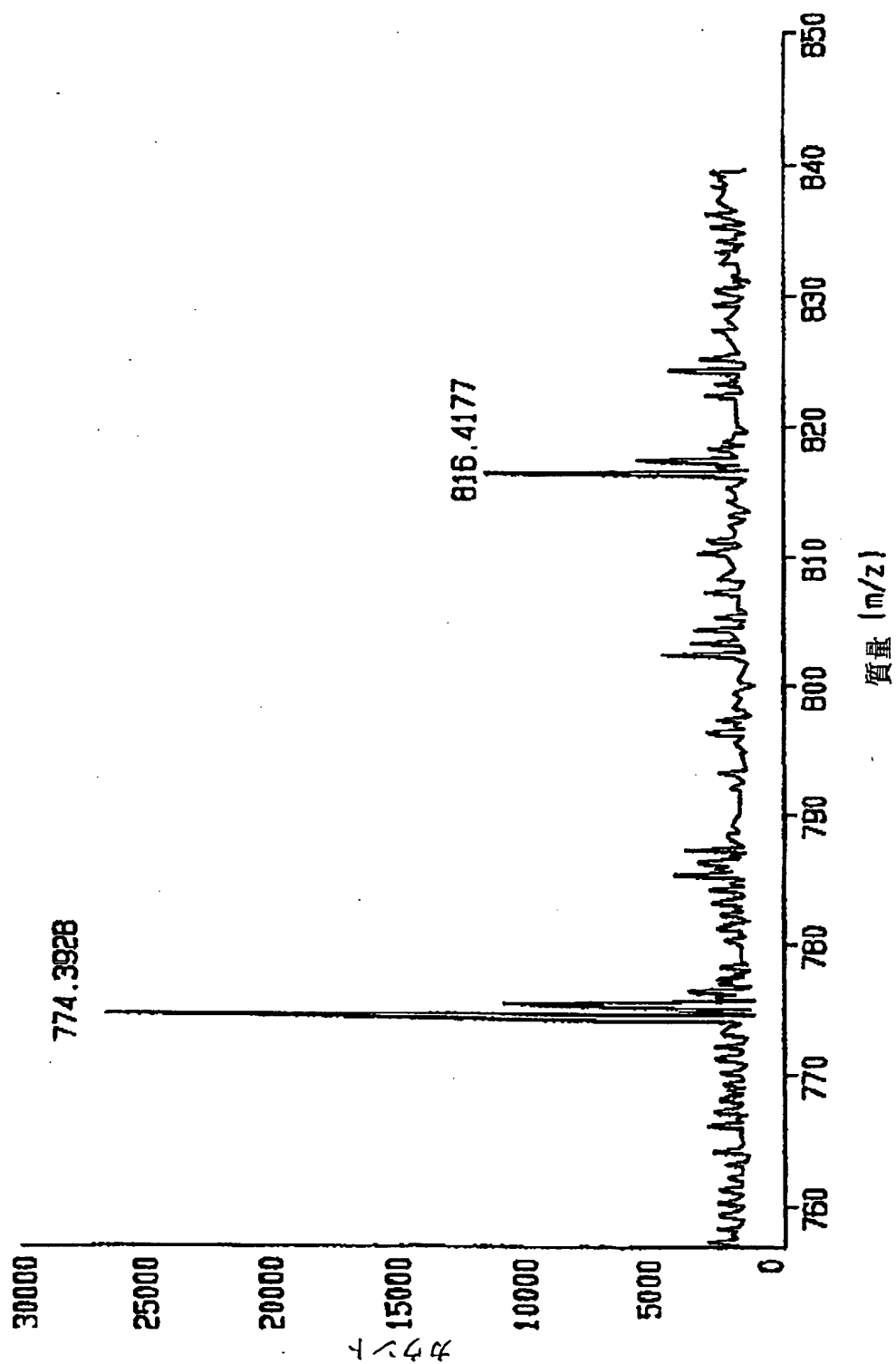


FIG. 3

【 図 4 】

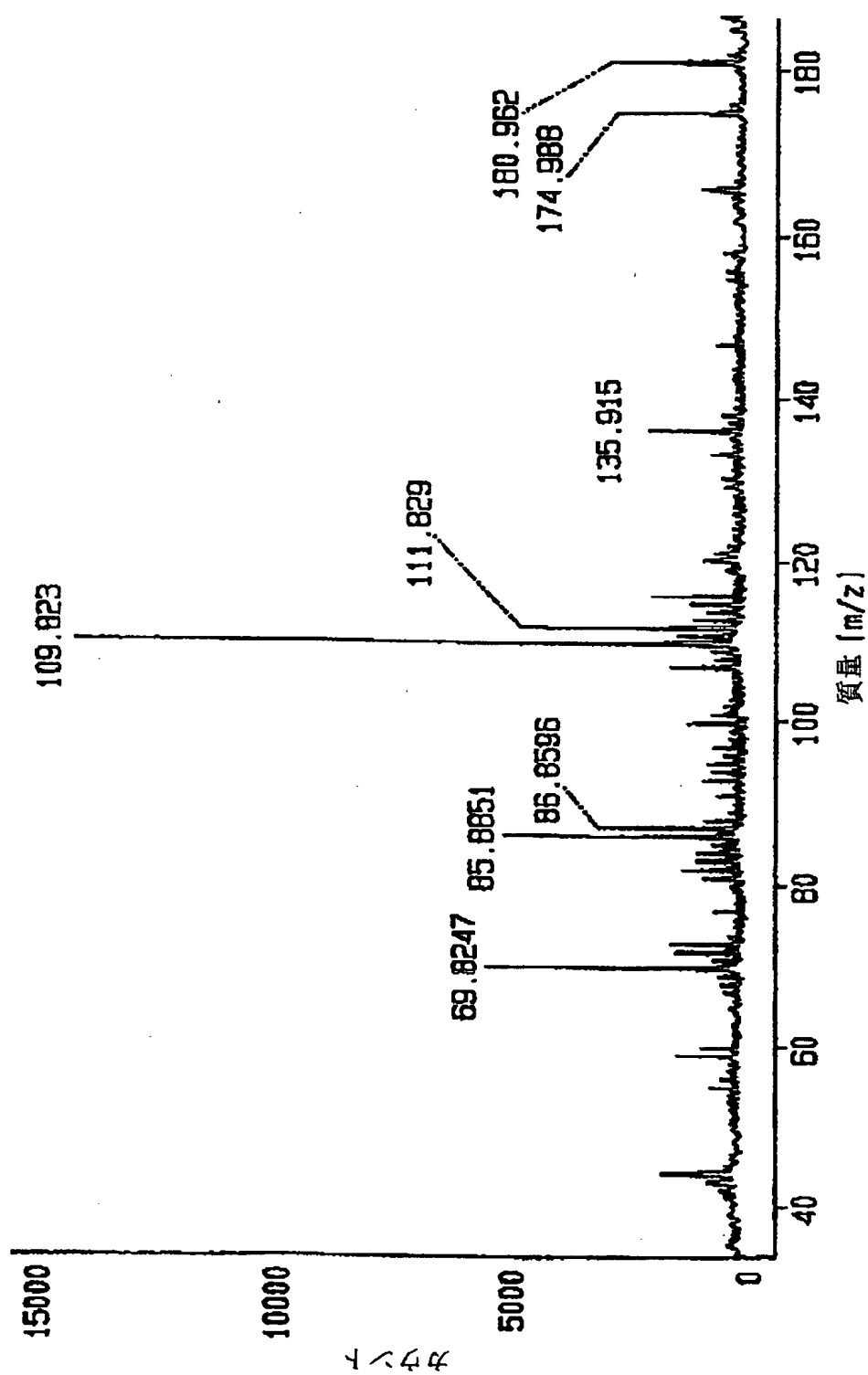


FIG. 4

【 図 5 】

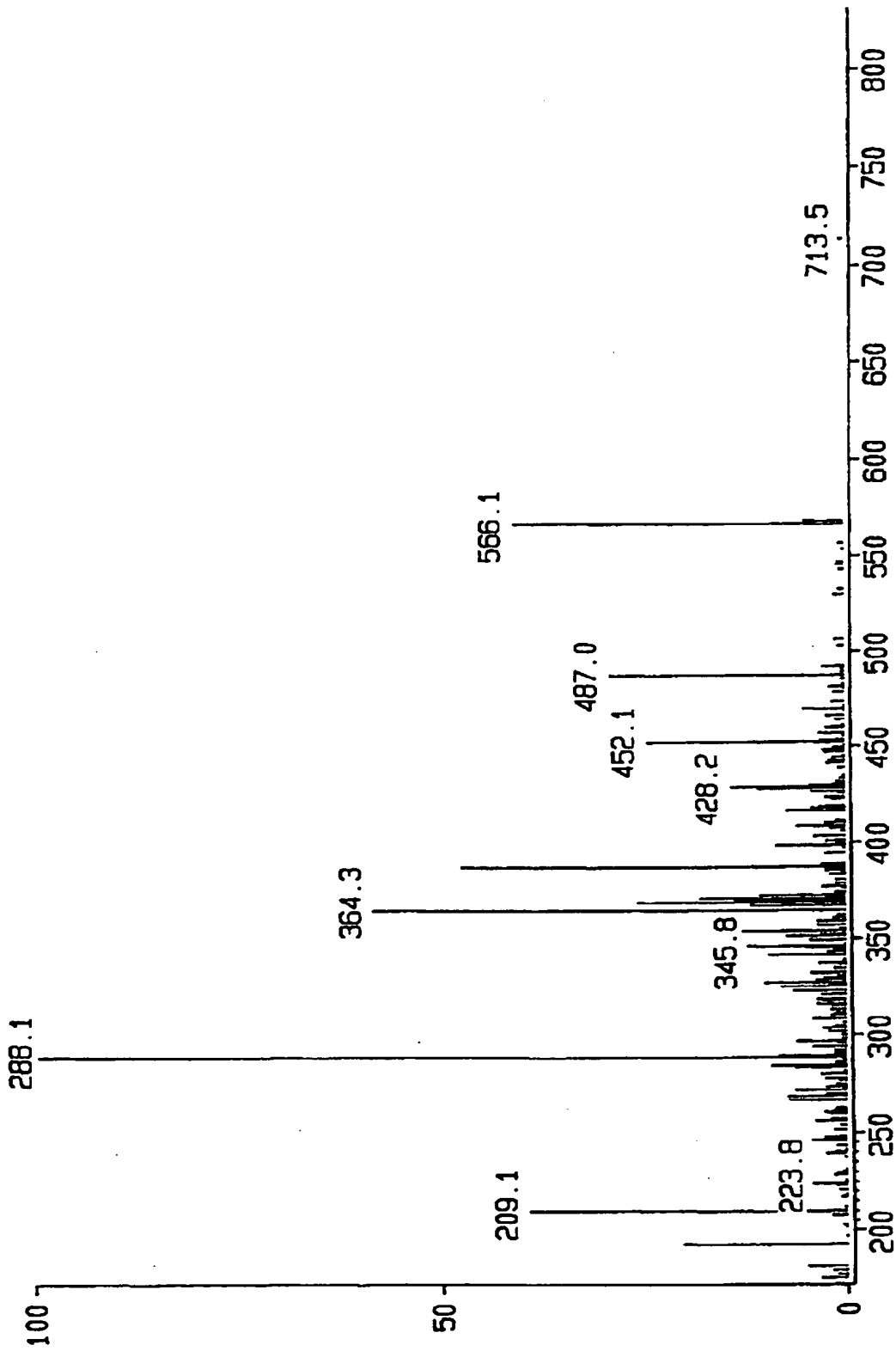


FIG. 5

【 図 6 】

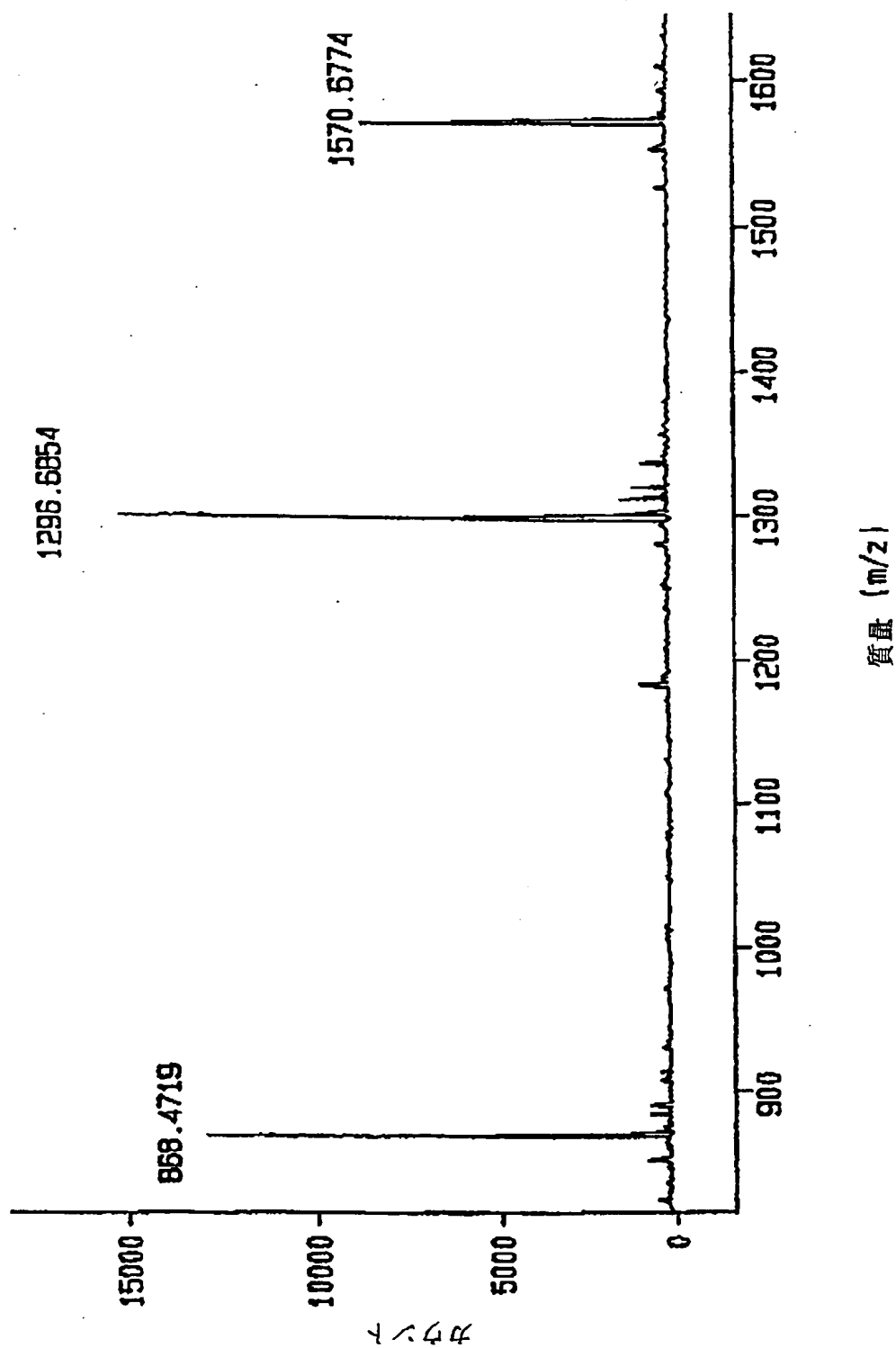


FIG. 6

【 図 7 】

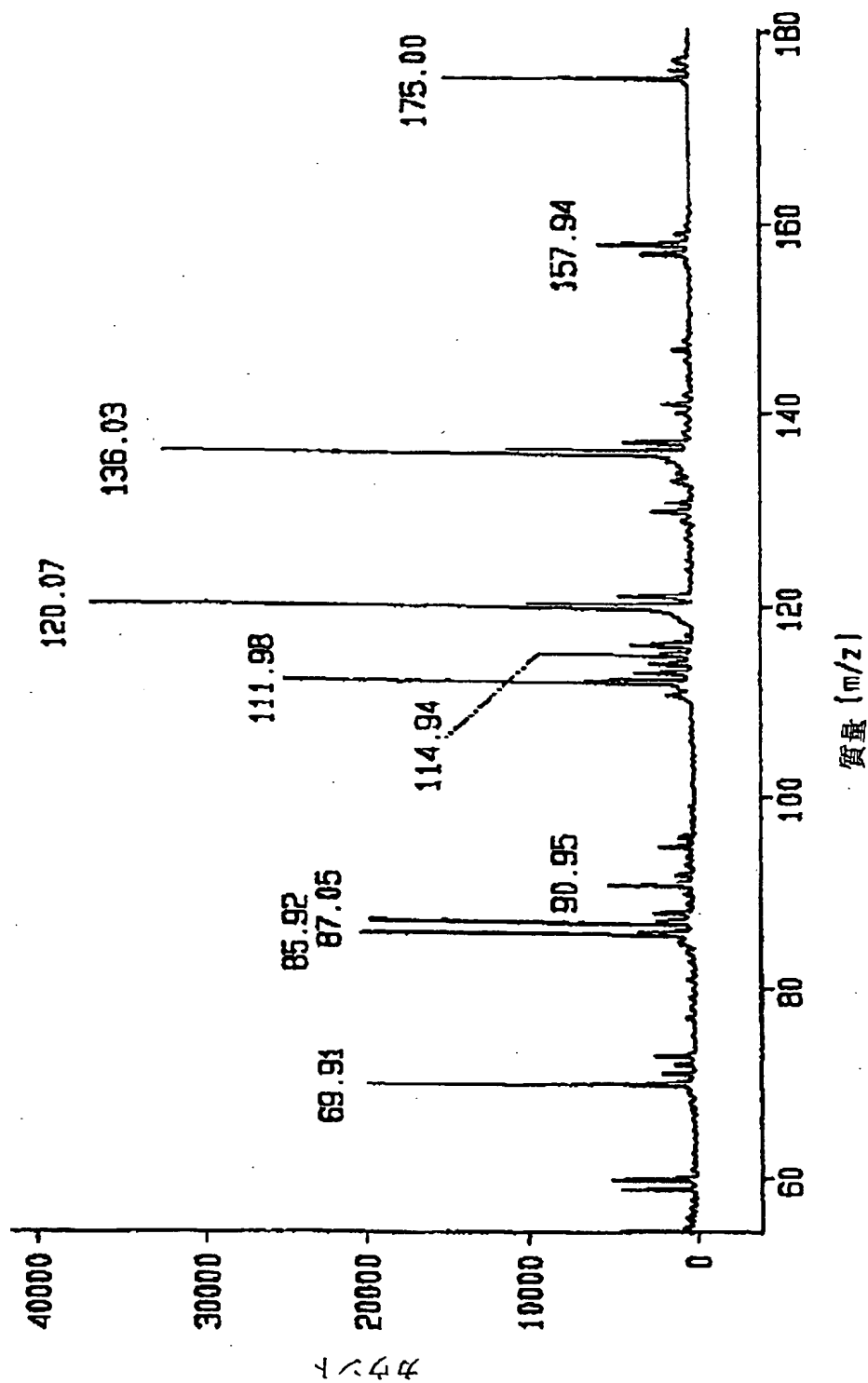


FIG. 7

【 图 8 】

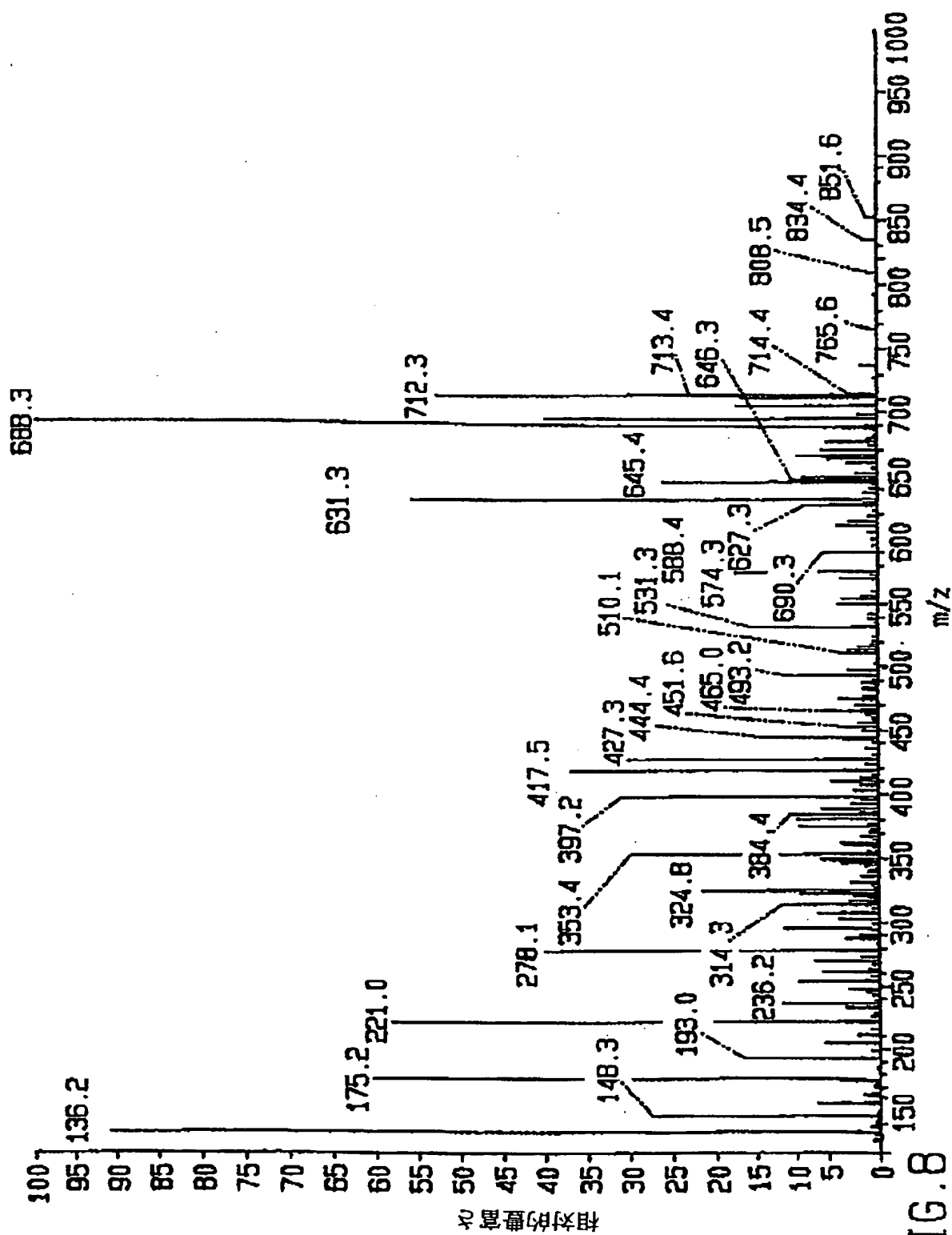


FIG. 8

【 図 9 】

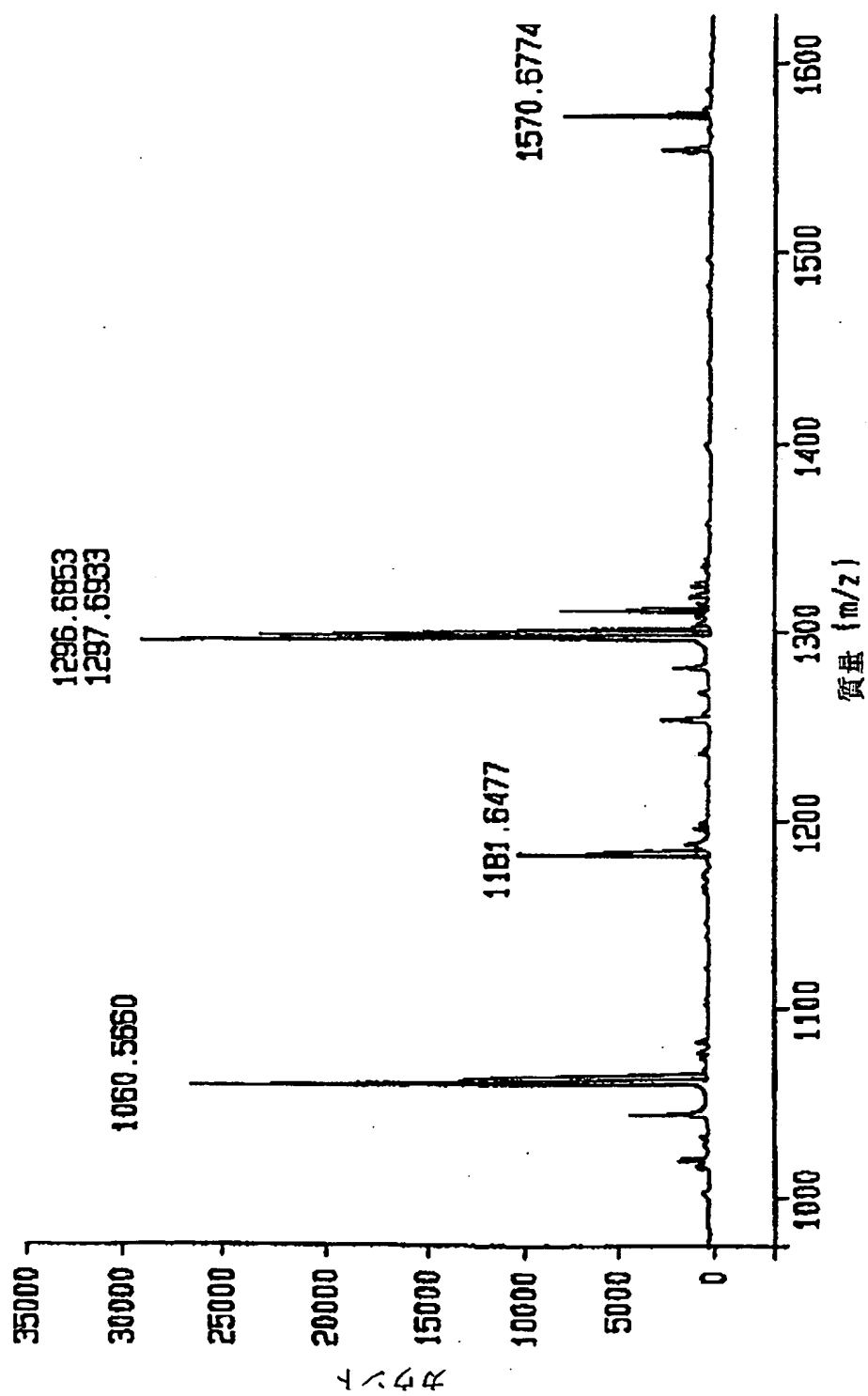


FIG. 9

【 図 1 0 】

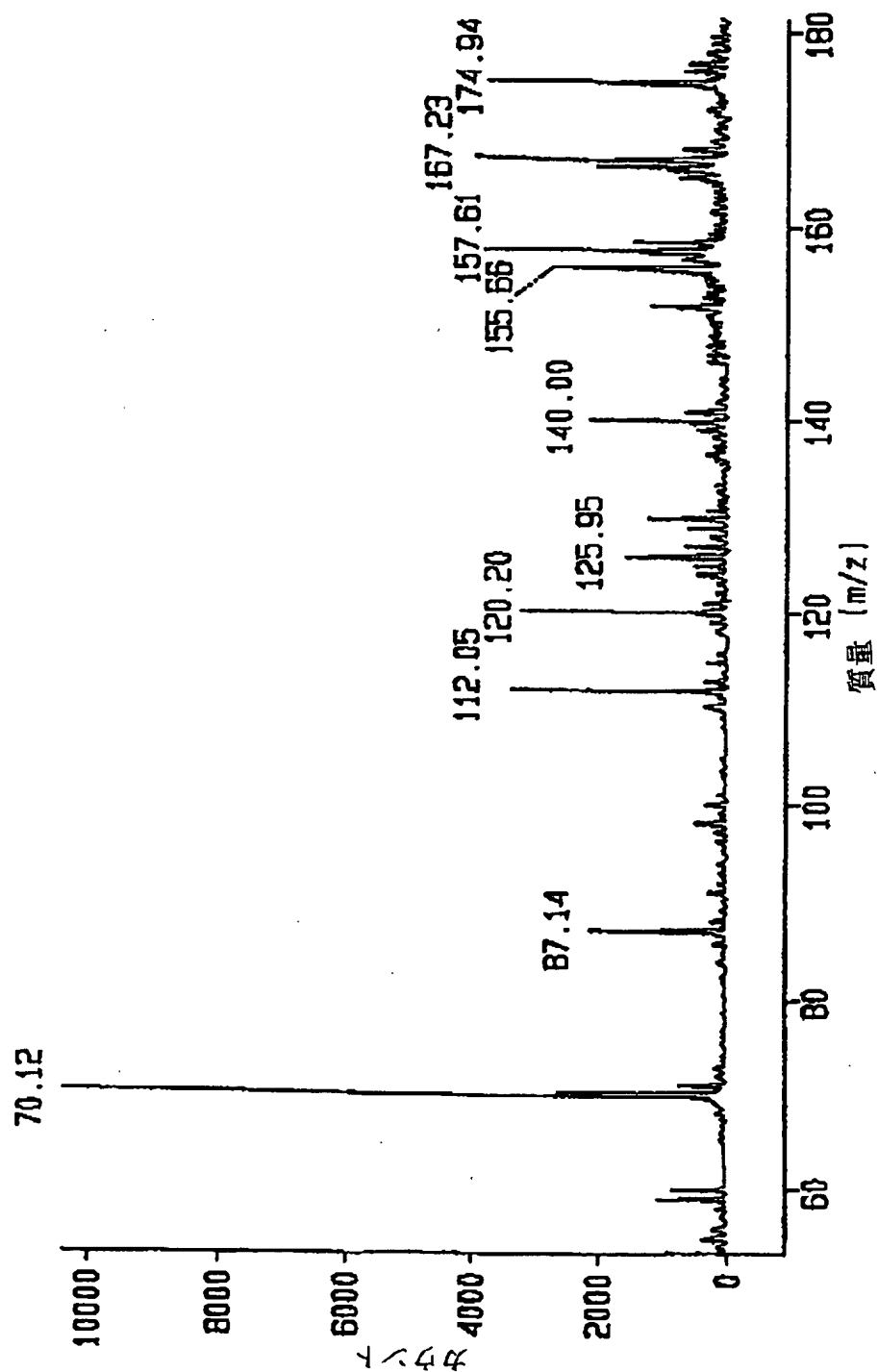


FIG. 10

【 図 1 1 】

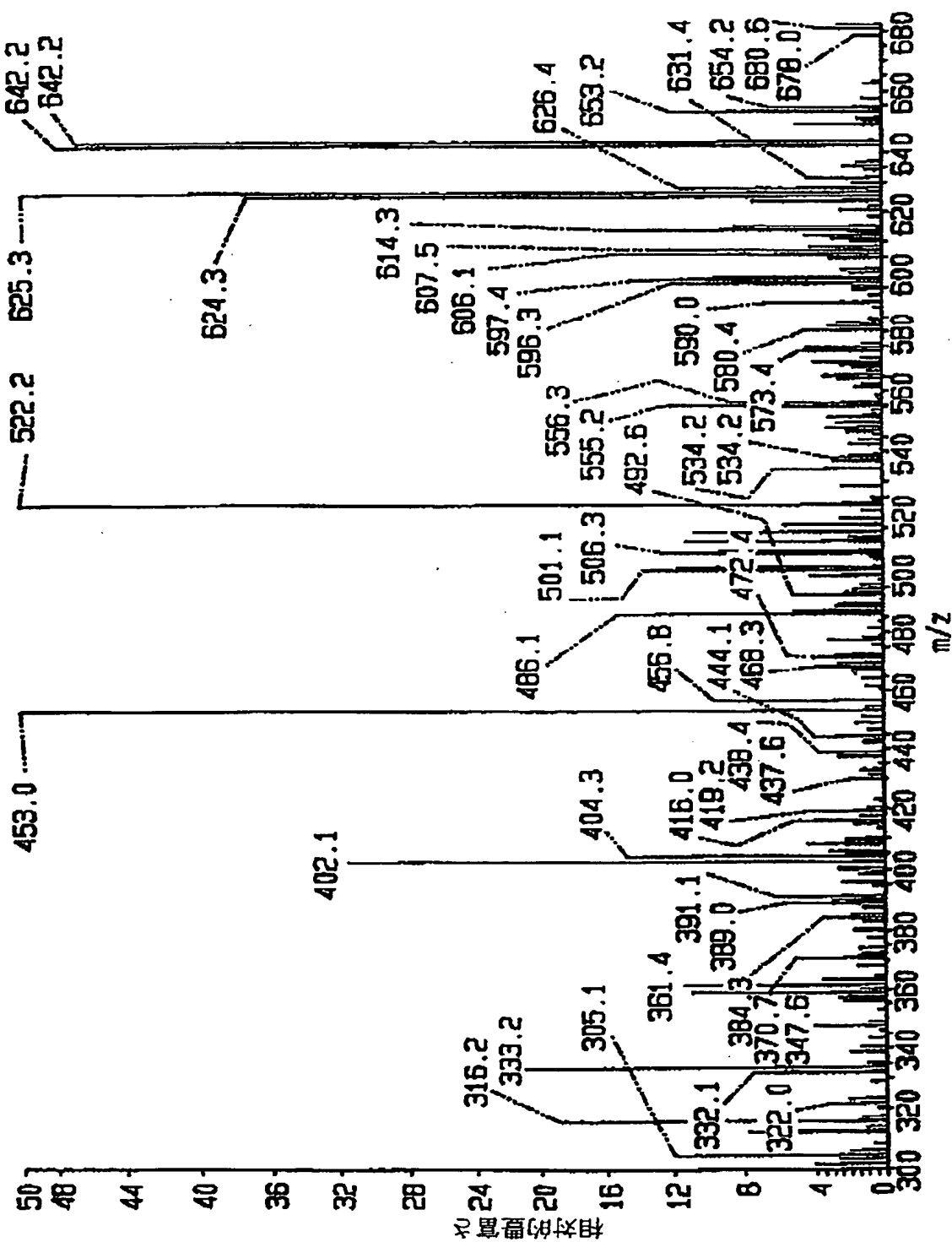


FIG.11

【 國際調查報告 】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER IPC 6 G01N33/68		I. International Application No. PCT/GB 98/01486
According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC		
B. FIELDS SEARCHED		
Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols) IPC 6 G01N		
Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched		
Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practical, search terms used)		
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	US 5 470 753 A (SEPETOV NIKOLAI ET AL) 28 November 1995 see column 1, line 53 - column 2, line 32 see column 3, line 32 - line 39	1-16
X	US 5 538 897 A (YATES III JOHN R ET AL) 23 July 1996 cited in the application see the whole document --- -/-	1-16
<input checked="" type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of box C. <input checked="" type="checkbox"/> Patent family members are listed in annex.		
* Special categories of cited documents: "A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance "E" earlier document but published on or after the international filing date "L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified) "O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means "P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed "T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention "X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone "Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art. "Z" document member of the same patent family		
Date of the actual completion of the international search 26 October 1998		Date of mailing of the international search report 20/11/1998
Name and mailing address of the ISA European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2 NL - 2280 HV Rijswijk Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl, Fax (+31-70) 340-3016		Authorized officer Hoekstra, S

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No.
PCT/GB 98/01486

C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	MEDZIHRADESZKY K F ET AL: "Peptide Sequence Determination by Matrix-Assisted Laser Desorption Ionization Employing a Tandem Double Focusing Magnetic-Orthogonal Acceleration Time-of-Flight Mass Spectrometer" JOURNAL OF THE AMERICAN SOCIETY FOR MASS SPECTROMETRY, vol. 7, no. 1, January 1996, page 1-10 XP004051936 see page 7 - page 8 ---	1-16
A	MEDZIHRADESZKY K F ET AL: "Protein sequence and structural studies employing matrix-assisted laser desorption ionization-high energy collision-induced dissociation" INTERNATIONAL JOURNAL OF MASS SPECTROMETRY AND ION PROCESSES, vol. 160, no. 1, January 1997, page 357-369 XP004058842 see the whole document ---	1-16
A	MANN M ET AL: "ERROR-TOLERANT IDENTIFICATION OF PEPTIDES IN SEQUENCE DATABASES BY PEPTIDE SEQUENCE TAGS" ANALYTICAL CHEMISTRY, vol. 66, no. 24, 15 December 1994, pages 4390-4399, XP000573399 see the whole document ---	1-16
A	WO 95 25737 A (PENN STATE RES FOUND ;BENKOVIC STEPHEN J (US); WINOGRAD NICHOLAS ()) 28 September 1995 see the whole document ---	11
A	J A BOUTIN, P HENNIG, P-H LAMBERT, S BERTIN, L PETIT, J-P MAHIEU, B SERKIZ, J-P VOLLAND, J-L FAUCHERE: "Combinatorial Peptide Libraries: Robotic Synthesis and Analysis by Nuclear Magnetic Resonance, Mass Spectrometry, Tandem Mass Spectrometry, and High-Performance Capillary Electrophoresis Techniques" ANALYTICAL BIOCHEMISTRY, vol. 234, 1996, pages 126-141, XP002081905 see the whole document ---	1-16

-/--

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No.

PCT/GB 98/01486

C. (Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	R S YOUNGQUIST, G R FUENTES, M P LACEY, T KEOUGH: "Generation and Screening of Combinatorial Peptide Libraries Designed for Rapid Sequencing by Mass Spectrometry" JOURNAL OF THE AMERICAN CHEMICAL SOCIETY, vol. 117, no. 14, 1995, pages 3900-3906, XP002081906 see the whole document ---	1-16
A	M A KELLY, H LIANG, I-I SYTWU, I VLATTAS, N L LYONS, B R BOWEN, L P WENNOGLE: "Characterization of SH2-Ligand Interactions via Library Affinity Selection with Mass Spectrometric Detection" BIOCHEMISTRY, vol. 35, no. 36, 1996, pages 17747-11755, XP002081907 see the whole document -----	1-16

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/GB 98/ 01486

Box I Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of item 1 of first sheet)

This International Search Report has not been established in respect of certain claims under Article 17(2)(e) for the following reasons:

1. ☒ Claims Nos.: 17, 18
because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:
Rule 39.1(v) PCT-Presentation of information
Rule 39.1(iii) PCT-
Scheme, rules and method for performing mental acts
Rule 39.1(v1) PCT -
2. ☐ Claims Nos.:
because they relate to parts of the International Application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful International Search can be carried out, specifically:
3. ☐ Claims Nos.:
because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

Box II Observations where unity of invention is lacking (Continuation of item 2 of first sheet)

This International Searching Authority found multiple inventions in this international application, as follows:

1. ☐ As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this International Search Report covers all searchable claims.
2. ☐ As all searchable claims could be searched without effort justifying an additional fee, this Authority did not invite payment of any additional fee.
3. ☐ As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this International Search Report covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.:
4. ☐ No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this International Search Report is restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claims Nos.:

Remark on Protest

- ☐ The additional search fees were accompanied by the applicant's protest.
- ☐ No protest accompanied the payment of additional search fees.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International Application No

PCT/GB 98/01486

Parent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
US 5470753 A	28-11-1995	AU 4844893 A WO 9406017 A	29-03-1994 17-03-1994
US 5538897 A	23-07-1996	CA 2185574 A EP 0750747 A JP 9510780 T WO 9525281 A	21-09-1995 02-01-1997 28-10-1997 21-09-1995
WO 9525737 A	28-09-1995	EP 0751950 A JP 9510711 T	08-01-1997 28-10-1997

フロントページの続き

(81)指定国 EP(AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE), OA(BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, ML, MR, NE, SN, TD, TG), AP(GH, GM, KE, LS, MW, SD, SZ, UG, ZW), EA(AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, CA, CH, CN, CU, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, GB, GE, GH, GM, GW, HU, ID, IL, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MD, MG, MK, MN, MW, MX, NO, NZ, PL, PT, RO, RU, SD, SE, SG, SI, SK, SL, TJ, TM, TR, TT, UA, UG, US, UZ, VN, YU, ZW

- (72)発明者 ブライム, サリー・バーバラ
イギリス、オーエックス2・0エヌエイ、
オックスフォード、ノース・ヒンクシー・
ビレッジ37番、サニーブルック
- (72)発明者 ウェド, ニック・シンクレア
イギリス、オーエックス2・0エヌエイ、
オックスフォード、ノース・ヒンクシー・
ビレッジ37番、サニーブルック
- (72)発明者 タウンゼンド, ロバート・レイド
イギリス、オーエックス1・4エスティ、
オックスフォード、ノーリーズ・アベニュー
33番

**This Page is Inserted by IFW Indexing and Scanning
Operations and is not part of the Official Record**

BEST AVAILABLE IMAGES

Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.

Defects in the images include but are not limited to the items checked:

- ☐ **BLACK BORDERS**
- ☐ **IMAGE CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES**
- ☐ **FADED TEXT OR DRAWING**
- ☐ **BLURRED OR ILLEGIBLE TEXT OR DRAWING**
- ☐ **SKEWED/SLANTED IMAGES**
- ☐ **COLOR OR BLACK AND WHITE PHOTOGRAPHS**
- ☐ **GRAY SCALE DOCUMENTS**
- ☐ **LINES OR MARKS ON ORIGINAL DOCUMENT**
- ☐ **REFERENCE(S) OR EXHIBIT(S) SUBMITTED ARE POOR QUALITY**
- ☐ **OTHER:** _____

IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.

As rescanning these documents will not correct the image problems checked, please do not report these problems to the IFW Image Problem Mailbox.